

Funktionelle Genomanalyse von sekretorischen Proteinen und den Wirtszell- Pathogen-Interaktionen des human- pathogenen Erregers *Listeria monocytogenes*

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

**von Matthias Trost
aus Freiburg im Breisgau**

1. Referent: Prof. Jürgen Wehland

2. Referent: Prof. Dieter Jahn

eingereicht am: 05.08.2004

mündliche Prüfung (Disputation) am: 08.10.2004

Name: Matthias Trost

Anschrift: Zum Ackerberg 1, 38126 Braunschweig

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich

1. die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Funktionelle Genomanalyse von sekretorischen Proteinen und den Wirtszell-Pathogen-Interaktionen des human-pathogenen Erregers *Listeria monocytogenes*“

selbständig verfasst,

mit Genehmigung des Vorsitzenden der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Technischen Universität Braunschweig, vertreten durch den Mentor der Arbeit,

vom 04.08.2004 bereits teilweise veröffentlicht,

nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet

und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben,

2. früher ein Promotionsgesuch noch nicht eingereicht habe.

Braunschweig, den 05.08.2004

.....

(Unterschrift)

VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Bierne, H., Mazmanian, S. K., Trost, M., Pucciarelli, M. G., Liu, G., Dehoux, P., Jansch, L., Garcia-del Portillo, F., Schneewind, O., and Cossart, P.,
Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence, *Mol.Microbiol.*, **43** [4], 869-881, (2002)

Trost, M., Wehmhöner, D., Kärst, U., Dieterich, G., Wehland, J., and Jansch, L.,
Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species, *Proteomics*, im Druck

Tagungsbeiträge:

Trost, M., Wehmhöner, D., Kärst, U., Dieterich, G., Wehland J., and Jansch, L.,
Comparative characterisation of supernatant proteins of the human pathogen *Listeria monocytogenes* and apathogenic *Listeria innocua*, *Bioperspectives*, Wiesbaden (2004)

Trost, M., Wehmhöner, D., Kärst, U., Dieterich, G., Wehland J., and Jansch, L.,
Comparative characterisation of supernatant proteins of the human pathogen *Listeria monocytogenes* and apathogenic *Listeria innocua*, *Jahrestagung der VAAM*, Braunschweig (2004)

Trost, M., Wehmhöner, D., Kärst, U., Dieterich, G., Wehland J., and Jansch, L.,
Functional Characterisation of the Secretome of the Human Pathogen *Listeria monocytogenes*, *Proteomics-Forum*, München (2003)

Trost, M., Wehmhöner, D., Kärst, U., Dieterich, G., Wehland J., and Jansch, L.,
Analysis of PrfA-dependent secretory proteins of the Human Pathogen *Listeria monocytogenes*, *Functional Genomics: From Bacteria to Man*, Greifswald (2003)

Trost, M., Wehland J., and Jansch, L.,
Host-cell response to *Listeria monocytogenes* invasion, *Human Proteome Organisation (HUPO)*, 2nd Annual congress, Montréal (2003)

Trost, M., Munder, R., Wehland J., and Jansch, L.,
Analysis of PrfA-dependent secretory proteins of *Listeria monocytogenes*, *Justus-Liebig-Symposium, Bioanalytical Quantum Steps*, Giessen (2003)

Trost, M., Bierne, H., Jansch, L., and Wehland J.,
Analysis of cell wall proteins involved in host-pathogen interactions, *Dechema*, Bielefeld, (2002)

Trost, M., Bierne, H., Jansch, L., and Wehland J.,
Gel-less proteomics approach for the identification of covalently bound cell wall proteins, *Jahrestagung der DGMS*, Heidelberg (2002)

Baumgärtner, M., Dieckmann, O., Kärst, U., Jänsch, L., Schaumburg, J., Trost M., and Wehland J.,

Overcoming the Limitations of standard 2D Gel-Electrophoresis, *Jahrestagung der DGMS*, Heidelberg (2002)

Trost, M., Bierne, H., Jänsch, L., and Wehland J.,

Gel-less proteome approach for the characterisation of low abundant cell wall proteins, *Jahrestagung der VAAM*, Göttingen, (2002)

Vorträge:

Trost, M., Bierne, H., Jänsch, L., and Wehland J.,

Analysis of cell wall proteins involved in host-pathogen interactions, Vortrag, *Hiddensee-Symposium*, 2002

INHALTSVERZEICHNIS

Vorveröffentlichungen der Dissertation	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungen und Fachbegriffe	VII
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI

1. Einleitung

1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.1.1. Der Infektionszyklus von <i>Listeria monocytogenes</i>	2
1.1.2. PrfA - der Virulenzgenaktivator von <i>Listeria monocytogenes</i>	3
1.2 Proteinsekretion Gram-positiver Bakterien	5
1.2.1 Signalpeptide	5
1.2.2 Der Sec-Translokationsweg	6
1.2.3 Sec-unabhängige Proteinsekretion	8
1.3 Die Oberflächen- und sekretorischen Proteine von <i>Listeria monocytogenes</i>	11
1.4 Listerielle Wirtszell-Pathogen-Interaktionen	15
1.4.1 Mechanismus der listeriellen Invasion	15
1.4.2 Mechanismus der intrazellulären Fortbewegung	19
1.5 Entwicklungen in der Proteomforschung	22
1.6 Zielsetzung der Arbeit	29

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Materialien	30
2.1.1 Allgemeine Puffer	30
2.2 Mikrobiologisches Arbeiten	31
2.2.1 Bakterienstämme	31
2.2.2 Plasmide	31
2.2.3 Kulturmedien und Zusätze	32
2.2.4 Anzucht von <i>Escherichia coli</i> und Gewinnung von Plasmiden	33
2.2.5 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	33
2.2.6 Anzucht von <i>Listeria</i>	34
2.2.7 Aufreinigung von Zellwänden von <i>Listeria monocytogenes</i>	34
2.2.8 Gewinnung listerieller Überstandsproteine	35

2.3 Zellbiologisches Arbeiten	36
2.3.1 Zelllinien	36
2.3.2 Medien und Zusätze	36
2.3.3 Stickstoffeinlagerung und Kulturbedingungen	37
2.3.4 Trypsinisieren und Passage	37
2.3.5 Transfektion eukaryontischer Zellen	38
2.4 Allgemeine biochemische Methoden	39
2.4.1 Proteinfällungen	39
2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford	40
2.4.3 SDS-PAGE	40
2.4.4 Proteinfärbungen	41
2.4.5 Semi-dry Blot	43
2.4.6 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	43
2.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese	44
2.5.1 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	44
2.5.2 Äquilibration	45
2.5.3 SDS-PAGE (2. Dimension)	46
2.6 Massenspektrometrie	47
2.6.1 MS-Probenvorbereitung nach 2D PAGE	47
2.6.2 Guanidinierung	47
2.6.3 Aufreinigen und Entsalzen der Peptide	48
2.6.4 Proteinidentifikation durch MALDI-TOF MS	48
2.6.5 Proteinidentifikation durch ESI-Q-TOF MS	49
2.6.6 Proteinidentifikation durch HPLC-MS	49
2.6.7 Auswertung der Massenspektren	50
2.6.8 Diskontinuierliche Expressionsanalyse (DEA)	51
2.7 Immunologisches Arbeiten	52
2.7.1 Antikörper	52
2.7.2 Immundetektion und Chemolumineszenz	53
2.7.3 Immunfluoreszenzmikroskopie fixierter Zellen	54
2.7.4 Geräte für die Immunfluoreszenzmikroskopie	55
2.8 Analyse der Wirtszellantwort auf listerielle Invasion	56
2.8.1 Infektion von eukaryontischen Zellen mit <i>Listeria monocytogenes</i>	56
2.8.2 Analyse der Wirtszellantwort nach Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	56
2.8.3 Analyse der Wirtszellantwort durch Puls-Chase Experimente	57
2.8.4 Analyse der Wirtszellantwort nach Induktion von Internalin B oder HGF	57

2.9 Transkriptionsanalyse	58
2.9.1 RNA-Isolierung	58
2.9.2 Genexpressionsanalyse	58
2.9.3 Auswertung der Genexpressionsanalyse	59

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von kovalent-gebundenen Zellwandproteinen von <i>L. monocytogenes</i>	61
3.2 Charakterisierung der sekretorischen Proteine von <i>Listeria monocytogenes</i>	64
3.3 Identifizierung von PrfA-abhängigen Proteinen im Sekretom von <i>Listeria monocytogenes</i>	73
3.4 Identifizierung von <i>Listeria monocytogenes</i> -spezifischen Proteinen im Sekretom	78
3.5 Charakterisierung der Wirtszellantwort nach Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> durch Methoden der Funktionellen Genomanalyse	83
3.5.1 Untersuchung von Gesamtzellextrakten von <i>Listeria</i> infizierten Wirtszellen	83
3.5.2 Untersuchung Igepal-extrahierter Proteinfractionen von <i>Listeria</i> -infizierten Wirtszellen	88
3.5.3 Untersuchung der Expressionsunterschiede nach listerieller Infektion mittels Transkriptommethoden	95
3.6 Charakterisierung der Wirtszellantwort auf Präsentation von Internalin B	100
3.7 Untersuchung der Kolokalisierung intrazellulärer <i>Listeria</i> mit der Focal Adhesion Kinase	102

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung sekretorischer und Zellwand-gebundener Proteine von <i>Listeria monocytogenes</i>	104
4.1.1 Untersuchung von kovalent-gebundenen Zellwandproteinen von <i>L. monocytogenes</i>	104
4.1.2 Untersuchung der sekretorischen Proteine von <i>L. monocytogenes</i>	107

4.2 Charakterisierung der Wirtszellantwort auf Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	117
4.2.1 Einfluß der experimentellen Bedingungen auf die Analyse der Wirtszellantwort	117
4.2.2 HeLa-Zellen zeigen eine geringe Wirtszellantwort auf listerielle Invasion	119
4.2.3 Stathmin wird durch listerielle Invasion und Internalin B spezifisch phosphoryliert	121
4.2.4 Hinweise auf Induktion von anti-apoptotischen Signalwegen in Wirtszellen nach Invasion durch <i>L. monocytogenes</i>	126
4.3 Ausblick	129
5. Zusammenfassung	131
6. Literatur	133
7. Danksagung	160
8. Anhang	161

ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
ABC	ATP-Binding-Cassette
ACN	Acetonitril
Ac	Acetat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BHI	brain heart infusion
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
°C	Grad Celsius
CCD	charge-coupled-device
CDS	Kodierende Gensequenzen (Coding sequences)
CID	Kollisions-induzierte Dissoziation
Da	Dalton
DEA	Diskontinuierliche Expressionsanalyse
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Electrospray Ionisation
EtSH	Mercaptoethanol
FA	Ameisensäure (Formic acid)
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Fötales Kälberserum
FT-ICR	Fourier-Transform Ionencyclotronenresonanz
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GST	Gluthation-S-Transferase
GW	Aminosäuremotiv aus Glycin-Tryptophan
HMM	Heijne's Weight Matrix Method
hnRNP	heterogenous nuclear Ribonucleoprotein K
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (High-Performance Liquid Chromatography)
IAP	Apoptoseinhibitor (Inhibitor of Apoptosis Protein)
ICAT	Isotope-coded Affinity Tag
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IM	Infektionsmedium
Inl	Internalin
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
LC	Flüssigkeitschromatographie
LID	Laser-induzierte Dissoziation
LPXTG	Aminosäuremotiv aus Leucin-Prolin-X-Threonin-Glycin
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
MCAT	Mass-coded Abundance Tag
MCP	Multichannel-Plate-Detektor
MG	Molekulargewicht
MOI	Multiplicity of Infection

mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MudPIT	Multidimensional Protein Identification Technology
NFκB	Nuclear Faktor Kappa B
NN	Neural Network
OD	optische Dichte
OMI	o-Methylisoharnstoff
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate Buffer Saline)
PFA	Paraformaldehyd
PIM	Prä-Infektionsmedium
PMF	Peptidmassenfingerabdruck-Verfahren (Peptide Mass Fingerprint)
PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluorid
protrusions	eine durch <i>L. monocytogenes</i> hervorgerufene Zellausstülpung
P/S	Penicillin/Streptomycin
PSD	Post-Source Decay (Zerfall von Ionen in einem Massenspektrometer nach der Ionisierung)
PTK	Phosphotyrosinkinase
PTS	Phosphotransferase-System
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q-TOF	Quadropol Flugzeit Massenanalysator (Time-of-Flight)
RNA	Ribonukleinsäure
RNC	Ribosome-nascent chain (Komplex aus Ribosom und wachsender Proteinkette)
RP	Reversed-Phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RuBPS	Ruthenium (II) tris- (bathophenanthrolin disulfonat)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SILAC	Stabile isotope labelling by amino acids in cell cultures
SP	Signalpeptid
SRP	Signal Recognition Particle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-buffered Saline)
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N, N-tetramethyl-ethylen-diamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMD	Transmembrandomäne(n)
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
TOF	Flugzeit Massenanalysator (Time-of-Flight)
U	Einheit (unit)
ü.N.	über Nacht
ÜS	Überstand
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VGC	Virulenzgencluster
w/v	Masse pro Volumen
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	Seite
Abb. 1.1: Der Infektionszyklus und die primären Virulenzfaktoren von <i>L. monocytogenes</i> .	2
Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Virulenzgenclusters (VGC) und der Internaline von <i>L. monocytogenes</i> .	4
Abb. 1.3: Der Sec-Translokationsweg.	7
Abb. 1.4: Die Oberflächenproteine von <i>Listeria monocytogenes</i> und ihre Verankerung an die Zellwand.	11
Abb. 1.5: Modell der Funktion der Sortase A in <i>Listeria monocytogenes</i> .	12
Abb. 1.6: Der schematische Aufbau der Internaline A bis C aus <i>L. monocytogenes</i> .	16
Abb. 1.7: HGF-vermittelte Signalwege.	17
Abb. 1.8: InlB-vermittelte Signalwege.	18
Abb. 1.9: Schematischer Aufbau eines MALDI TOF Massenspektrometers.	24
Abb. 1.10: Schematischer Aufbau eines Q-TOF Massenspektrometers.	25
Abb. 1.11: Gebildete Peptidfragmente während Dissoziation in einem Q-TOF-Massenspektrometer.	26
Abb. 3.1: ESI Q-TOF Massenspektren von tryptischen Peptiden kovalent-gebundener Zellwandproteine von <i>L. monocytogenes</i> .	63
Abb. 3.2: RuBPS-gefärbtes 2D-Gel der Überstandsproteine von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e wt.	66
Abb. 3.3: Wachstumskurven von <i>L. monocytogenes</i> EGDe wt und $\Delta prfA$ in Minimalmedium.	72
Abb. 3.4: Differentielle Expression von Internalin C im Sekretom von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e wt und $\Delta prfA$.	73
Abb. 3.5: Wachstumskurven von <i>L. monocytogenes</i> EGDe wt und <i>L. innocua</i> CLIP11262 wt in Minimalmedium.	77
Abb. 3.6: ^{35}S -Autoradiogramme von <i>L. monocytogenes</i> wt- infizierten und mit $\Delta prfA$ stimulierten HeLa-Zellen im Bereich von pH 3-10.	84
Abb. 3.7: Proteomweaver 3D-Ansicht der Spotvolumen im Bereich um Stathmin	86
Abb. 3.8: RuPBS-gefärbte 2D-Gele im Bereich von pH 4-7 von Proteinextrakten aus HeLa-Zellen nach 6stündiger Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> und nicht-infizierten Kontrollzellen.	87

Abb. 3.9:	ProQ-gefärbte 2D-Gele im Bereich von pH 4-7 von Proteinextrakten aus HeLa-Zellen nach 6stündiger Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> wt und nicht-infizierten Kontrollzellen.	89
Abb. 3.10:	In von <i>L. monocytogenes</i> wt infizierten HeLa-Zellen wird Isoform II von Keratin 8 um den Faktor 10 stärker phosphoryliert als in den mit <i>L. monocytogenes</i> $\Delta prfA$ -infizierten Kontrollzellen.	90
Abb. 3.11:	2D-Western Blots von Stathmin aus HeLa-Zellen nach 6 h Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> wt (A) und nicht-infizierten Kontrollzellen (B).	92
Abb. 3.12:	Scatter-Blot der normalisierten Signalintensitäten der Microarray-Hybridisierungen.	95
Abb. 3.13:	2D-Western Blots von Stathmin aus HeLa-Zellen nach 30 min Inkubation mit 1,5 nM HGF (A), 1,5 nM InlB ₃₂₁ (B) und Kontrolle (C).	100
Abb. 3.14:	Immunfluoreszenzmikroskopieaufnahme von mit <i>L. monocytogenes</i> wt infizierten HeLa-Zellen.	102
Abb. 4.1:	Vergleich von publizierten 2D-Phosphorylierungsmustern und dem erhaltenen Muster nach 30minütiger InlB-Stimulation.	122
Abb. 4.2:	Stathmin, ein Relaisprotein zwischen Mikrotubuli, Aktincytoskelett und Zellzyklus.	125
Abb. 4.3:	Die in dieser Arbeit gezeigten, durch InlB bzw. <i>Listeria monocytogenes</i> induzierten Gene und Proteinphosphorylierungen.	128
Abb. 8.1:	2D-Gel der Überstandsproteine von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e wt (pH 7-11).	161
Abb. 8.2:	2D-Gel der Überstandsproteine von <i>L. monocytogenes</i> $\Delta prfA$.	161
Abb. 8.3:	2D-Gel der cytosolischen Proteine von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e wt.	164
Abb. 8.4:	2D-Gel der cytosolischen Proteine von <i>L. monocytogenes</i> $\Delta prfA$.	164
Abb. 8.5:	2D-Gel der cytosolischen Proteine von <i>L. innocua</i> CLIP11262 wt.	165

TABELLENVERZEICHNIS

	Seite
Tabelle 2.1: In der Arbeit benutzte Bakterienstämme	31
Tabelle 2.2: In der Arbeit benutzte Plasmide	31
Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotikazusätze	33
Tabelle 2.4: In der Arbeit benutzte Zelllinien	36
Tabelle 2.5: Spannungsgradient IPGphor	45
Tabelle 2.6: Spannungsgradient Multiphor	45
Tabelle 2.7: Monoklonale primäre Antikörper (Serumüberstände)	52
Tabelle 2.8: Sekundäre Antikörper	52
Tabelle 2.9: Polyklonale Antikörper	52
Tabelle 2.10: Sonstige Lösungen für die Immunfluoreszenz	53
Tabelle 3.1: Identifizierte Proteine in den Zellwandfraktionen von <i>L. monocytogenes</i> wt und Δ srtA	62
Tabelle 3.2: Bioinformatische Vorhersage von Sekretionssignalen von <i>L. monocytogenes</i>	64
Tabelle 3.3: Identifizierte Proteine mit Sekretionssignal im Kulturüberstand von <i>L. monocytogenes</i>	68
Tabelle 3.4: Identifizierte Proteine ohne Sekretionssignal im Kulturüberstand von <i>L. monocytogenes</i>	69
Tabelle 3.5: PrfA-regulierte Proteine im Kulturüberstand von <i>L. monocytogenes</i>	74
Tabelle 3.6: <i>L. monocytogenes</i> -spezifische Überstandsproteine ohne Ortholog in <i>L. innocua</i>	79
Tabelle 3.7: <i>L. monocytogenes</i> -spezifische Überstandsproteine mit Ortholog in <i>L. innocua</i>	80
Tabelle 3.8: Identifikationen und Regulationen von unterschiedlich exprimierten Proteinen zwischen <i>L. monocytogenes</i> wt und Δ prfA infizierten HeLa-Zellen nach 35 S-Autoradiographie.	84
Tabelle 3.9: Aus ProQ-gefärbten 2D-Gelen identifizierte Proteine	90
Tabelle 3.10: Differentielle Genexpression von <i>L. monocytogenes</i> wt infizierten HeLa-Zellen im Vergleich mit nicht-infizierten HeLa-Zellen mit einer Regulation von $>\pm 2$	96

Tabelle 8.1: Identifizierte Proteine im Kulturüberstand von <i>L. innocua</i>	162
Tabelle 8.2a: Vorhergesagte sekretorische Proteine von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	166
Tabelle 8.2b: Proteine, bei denen Funktion und Vorhersage für die Sekretion widersprüchlich sind	168
Tabelle 8.2c: Aus der ursprünglichen Annotation entfernte nicht-sekretorische Proteine	168
Tabelle 8.3: Vorhergesagte Oberflächen-assoziierte Proteine von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	169
Tabelle 8.4: Vorhergesagte assoziierte und integrale Membranproteine von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	172

1. EINLEITUNG

1.1 *Listeria monocytogenes*

Listerien sind eine nach dem Mediziner Joseph Lister benannte Gattung von Gram-positiven, nicht-sporulierenden Stäbchenbakterien mit geringem G+C-Gehalt, die ubiquitär in Boden und Wasser vorkommen. Zur Gattung *Listeria*, die phylogenetisch nahe mit den Gattungen *Bacillus*, *Chlostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* und *Staphylococcus* verwandt ist, gehören 6 Arten, die apathogenen *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welsheri* und *L. grayi*, sowie die tierpathogene Art *L. ivanovii* und die tier- und humanpathogene Art *L. monocytogenes*.

Listerien besitzen die ungewöhnlichen Eigenschaften sich selbst bei Temperaturen um 0°C, extremen pH-Werten und hohen Salzkonzentrationen vermehren zu können, und stellen daher ein enormes Problem für die Nahrungsmittelindustrie dar. Dementsprechend wird *L. monocytogenes* zumeist durch Lebensmittel auf den Menschen übertragen und kann zu ernsthaften Erkrankungen führen.

Nach Aufnahme von kontaminierter Nahrung können Listerien das Darmepithel überwinden und so in den Blutkreislauf gelangen, von wo aus sie Leber, Milz und andere innere Organe infizieren können. Durch ihre ungewöhnliche Fähigkeit, sowohl die Blut-Hirn-Schranke als auch die Plazentaschranke überwinden zu können, führt eine Listerieninfektion (Listeriose) in immunkomprimierten Personen oft zu Meningitis und Meningoenzephalitis sowie zu perinatalen Infektionen und zum Abort in Schwangeren (für Referenzen siehe: Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Da die ersten grippeähnlichen Symptome einer Listeriose oft verkannt werden, führen fortgeschrittene Infektionen trotz Antibiotikabehandlung häufig zum Tode. So wurden z. B. in dem Zeitraum 1985-1991 in den USA 2500 Listerioseerkrankungen gemeldet, von denen 500 tödlich endeten (US Department of Health and Human Services, 2001), während die 13.000 Salmonellen-Infektionen in den USA jährlich nur zu 50 Todesfällen führten (Mishu *et al.*, 1994).

Die Genome von *L. innocua* und *L. monocytogenes* wurden 2001 vom Europäischen *Listeria* Genom Konsortium sequenziert (Glaser *et al.*, 2001), die der anderen *Listeria*-Arten werden momentan entschlüsselt. Die Genome von *Listeria monocytogenes* und *Listeria innocua* besitzen beide rund 3 Mio. Basenpaare, die für 2853 bzw. 2973 potentielle Gene kodieren. Darunter sind 270 Gene spezifisch für *L.*

monocytogenes und 149 spezifisch für *L. innocua* (ohne Phagen-spezifische Gene) (Glaser *et al.*, 2001).

1.1.1. Der Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes*

Der charakteristische listerielle Infektionszyklus ist schematisch in der Abbildung 1.1 dargestellt (Tilney and Portnoy, 1989).

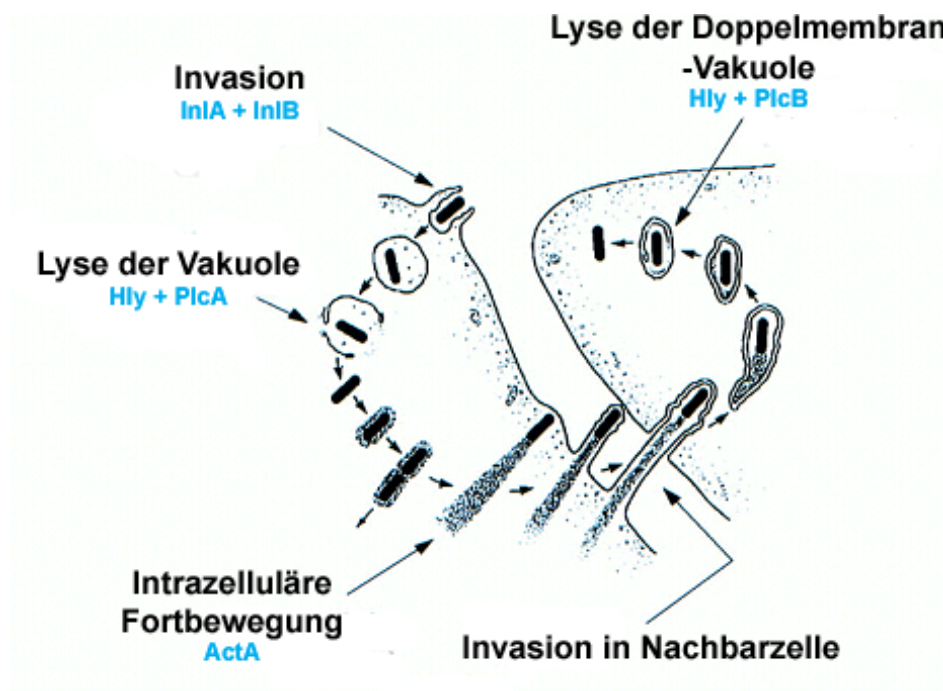


Abb. 1.1: Der Infektionszyklus und die primären Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* (nach Tilney und Portnoy, 1989).

L. monocytogenes ist befähigt seine eigene Phagozytose durch die Oberflächenproteine Internalin A (InlA) und B (InlB) zu induzieren. Nach der Aufnahme entkommt das Bakterium dem Phagosom durch das Auflösen der Vakuolenmembran durch Listeriolysin (Hly) und die Phosphatidyl-spezifischen Phospholipase A (PlcA). Nach der Proliferation wird durch den bakteriellen Faktor ActA wirtseigenes Aktin an einem Bakterienpol polymerisiert, wodurch eine intrazelluläre Fortbewegung vermittelt wird. Treffen die Bakterien auf die Membran, bilden sich Ausstülpungen, so genannte „Protrusions“, die von der Nachbarzelle aufgenommen werden. Durch Sekretion von Phosphatidylcholin (Lezithin)-spezifischer Phospholipase C (PlcB) und Hly wird die Doppelmembranvakuole aufgelöst und das Bakterium liegt im Cytosol der Nachbarzelle vor.

L. monocytogenes induziert seine eigene Aufnahme in nicht-phagozytierende Zellen durch die Internaline A und B, welche die Adhäsion und Invasion durch spezifische Bindung an Wirtszellproteine einleiten (Gaillard *et al.*, 1991; Dramsi *et al.*, 1993; Lingnau *et al.*, 1995). Nach der Invasion befinden sich die Bakterien in einer primären Vakuole, die durch die Sekretion des Listeriolysins, eines hämolytischen

Zytolysins (Hly) (Geoffroy *et al.*, 1987), und der durch die Metalloprotease (Mpl) aktivierten (Poyart *et al.*, 1993) Phosphatidyl-spezifischen Phospholipase A (PlcA) (Camilli *et al.*, 1991) zerstört wird. Die freigesetzten Listerien können sich nun im Zytoplasma vermehren. Nach der Zellteilung wird an dem neuen Zellpol Aktin der Wirtszelle rekrutiert und mittels des Aktin-Nukleationsfaktors ActA werden zelluläre Komponenten wie der Arp2/3-Komplex gebunden und Aktin polymerisiert (Domann *et al.*, 1992; Cameron *et al.*, 1999). Durch die Polymerisierung können sich die Listerien ungerichtet durch die Wirtszelle schieben. Stoßen sie an die Plasmamembran, entstehen Ausstülpungen, so genannte „Protrusions“, die in der Nachbarzelle abgeschnürt werden. Die Bakterien sind nun von einer Doppelmembran eingeschlossen, die sie mittels Sekretion der Phosphatidylcholin (Lezithin)-spezifischen Phospholipase C (PlcB) und Listeriolysin (Hly) auflösen (Vazquez-Boland *et al.*, 1992). Anschließend liegen die Listerien erneut frei im Zytoplasma der Wirtszelle vor und können ihren Infektionszyklus fortsetzen.

Mit dieser Strategie können sich die Erreger von einer Wirtszelle zur nächsten bewegen, ohne dabei mit dem extrazellulären Raum in Kontakt zu geraten. Daher sind sie durch die humorale Immunantwort des Wirtsorganismus, wie z.B. zirkulierenden Antikörpern und neutrophilen Granulozyten, nicht angreifbar. In diesem Stadium ist eine Abwehr der Infektion nur noch durch die zellvermittelte Immunantwort möglich (Edelson and Unanue, 2000; Cossart and Bierne, 2001).

1.1.2. PrfA - der Virulenzgenaktivator von *Listeria monocytogenes*

Der einzige bekannte Transkriptionsregulator für die oben beschriebenen, primären Virulenzfaktoren (siehe Kapitel 1.1.1) ist PrfA. PrfA gehört strukturell und funktionell zur Familie der Crp/Fnr-Transkriptionsregulatoren (Lampidis *et al.*, 1994) und bindet an eine 14 bp lange palindromische PrfA-Bindesequenz (PrfA-Box), die ~40 bp vor dem Transkriptionsstart liegt (Mengaud *et al.*, 1989; Sheehan *et al.*, 1996). PrfA ist u.a. für die Regulation des so genannten Virulenzgen-Clusters (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*) und der meisten Internaline (z.B. *inlA*, *inlB*, *inlC*) verantwortlich, deren Produkte nachweislich für die Pathogenität von *L. monocytogenes* verantwortlich sind (Kapitel 1.1.1 & Abbildung 1.2).

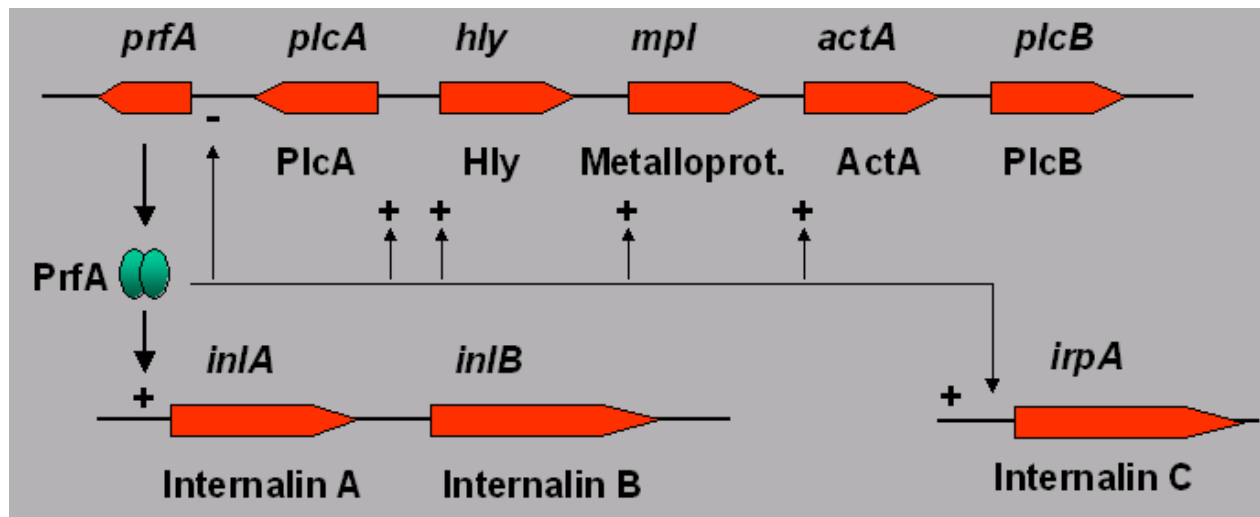


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Virulenzgenclusters (VGC) und der Internalingene von *L. monocytogenes*.

PrfA unterliegt der negativen Autoregulation und induziert die Transkription des VGC (*plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB*) ebenso wie die der Internaline (*inlA* und *inlB*, *inlC*).

Insgesamt besitzen 286 Gene von *L. monocytogenes* eine mögliche PrfA-Bindestelle mit einem Maximum von zwei Fehlstellen zum perfekten Palindrom (Glaser *et al.*, 2001). Induktion der PrfA-abhängigen Transkription erfolgt bei 37°C und ist schwach bei 30°C (Leimeister-Wachter *et al.*, 1992). Dies wird durch eine Sekundärstruktur der *prfA*-mRNA, die eine Bindung an die Ribosomen verhindert, post-transkriptionell reguliert. Die Sekundärstruktur faltet sich bei zunehmender Temperatur auf und ermöglicht eine maximale Translation bei 37°C (Johansson *et al.*, 2002). Auch unter Stressbedingungen findet unter bisher nicht bekannten Gründen eine Induktion von *prfA* statt (Bohne *et al.*, 1994; Ripio *et al.*, 1996; Johansson *et al.*, 2002).

Zusätzlich zur direkten transkriptionellen Regulation scheint es auch eine indirekte PrfA-abhängige Kontrolle zu geben: Eine Transkriptomanalyse zeigte, dass eine beträchtliche Anzahl von Genen ohne jegliche putative PrfA-Bindestelle durch PrfA reguliert wird (Milohanovic *et al.*, 2003). Für einige Virulenzgene (Kazmierczak *et al.*, 2003) und für *prfA* selbst (Nadon *et al.*, 2002) wurden zudem Bindestellen des zentralen Stressantwort-Regulators sigma B (σ^B) beschrieben.

1.2 Proteinsekretion Gram-positiver Bakterien

In allen Zellen müssen Proteine von ihrem Herstellungsort zu ihrem endgültigen Bestimmungsort transportiert werden. Dafür gibt es eine Vielzahl von unterschiedlichen Signalsequenzen, die für den entsprechenden Zielort 'adressieren'. Extrazelluläre Proteine Gram-positiver Bakterien müssen über die Membran und die Zellwand hinweg exportiert werden. Hierzu werden die Proteine zumeist in einer Vorläuferform (Präproteine) mit einem Amino-terminalen Signalpeptid synthetisiert. Die Präproteine werden entweder von den Ribosomen direkt an der Membran synthetisiert (Co-translationale Translokation) oder nach vollendeter Synthese zur Membran transportiert (für Übersichtsartikel siehe: Rapoport *et al.*, 1996), was erfordert, dass Chaperone zu diesem Zeitpunkt das Falten der Proteine verhindern (für Übersichtsartikel siehe: Beissinger and Buchner, 1998). Das Signalpeptid wird von Transportproteinen erkannt und das Protein unter Verbrauch von ATP an den richtigen Ort transloziert. Nach oder während der Translokation werden die Signalpeptide von spezialisierten Signalpeptidasen abgeschnitten und das Protein mit Hilfe von Chaperonen zur reifen Form gefaltet.

Bisher sind für Gram-positive Bakterien sechs verschiedene Translokationswege bekannt: der Sec-Translokationsweg, durch den Bakterien den Großteil ihrer Proteine sekretieren (Oliver and Beckwith, 1982), der Twin-Arginine Translokationsweg (Tat) (Chaddock *et al.*, 1995), der Pseudopilin Transportweg zur Kompetenzentwicklung (Bleves *et al.*, 1998), spezifische ABC-Transporter (Koronakis and Hughes, 1993), der ESAT-6 Sekretionsweg für kleine Proteine (Gey Van Pittius *et al.*, 2001; Pallen, 2002) und der SecA2-Translokationsweg (Braunstein *et al.*, 2001).

1.2.1 Signalpeptide

Der größte Anteil aller Signalpeptide (SP) wird in Gram-positiven Bakterien von den Typ I Signalpeptidasen (SPasen) prozessiert. Die SP dieses Typs bestehen aus drei Domänen: die N-Terminale Domäne enthält eine Reihe von positiv geladenen Aminosäuren, die zentrale H-Domäne Aminosäuren mit sehr hydrophoben Resten und die darauf folgende C-Domäne das SPase I-Erkennungssignal $^{-3}\text{Ala}^{-2}\text{X}^{-1}\text{Ala}\downarrow$ (Nielsen *et al.*, 1997), wobei der Pfeil für die Schnittstelle und X für jegliche Aminosäure steht. Eine Untergruppe der SP des Typ I enthält statt des üblichen Ala-

X-Ala-Signals ein sogenanntes Twin-Arginin-Motiv (Arg-Arg-X-Φ-Φ) (Cristobal *et al.*, 1999), wobei Φ jegliche hydrophobe Aminosäure sein kann.

In *Listeria monocytogenes* sind bisher drei SPasen der Klasse I identifiziert worden: Lmo1269 (SipX), Lmo1270 (SipY) und Lmo1271 (SipZ) (Bonnemain *et al.*, 2004).

Eine zweite Klasse von SP wird in Prälipoproteinen gefunden, die durch die SPase II prozessiert werden (Tokunaga *et al.*, 1985). Diese SP sind kürzer als die SP der Klasse I und besitzen die charakteristische 'Lipobox' mit der Sequenz $^{-3}\text{Leu}^{-2}\text{Ala/Ser}^{-1}\text{Ala/Gly}\downarrow\text{-Cys}^{+1}$. An den konservierten Cysteinrest wird durch die Diacylglyceryltransferase (Lgt) die Lipidmodifikation gebunden und durch das anschließende Schneiden der SPase II ist dieses Cystein mit Lipidrest der erste AS-Rest im 'reifen' Protein.

Das Genom von *L. monocytogenes* kodiert für zwei SPasen der Klasse II: Lmo1844 (Lsp) (Reglier-Poupet *et al.*, 2003a) und Lmo1101.

Proteine mit SP der Typen I und II werden üblicherweise über Sec transloziert. Aber auch die durch den Pseudopilinweg exportierten Proteine besitzen SPase I und II-ähnliche SP. Die SPase ComC (Lmo1550) schneidet im Cytosol an der Sequenz $^{-2}\text{Lys}^{-1}\text{Gly}\downarrow\text{Phe}^{+1}\text{-X}_3\text{-Glu}^{+5}$, die zwischen der N- und der H-Domäne des SP liegt (Chung and Dubnau, 1995).

Die SP der durch ABC-Transporter translozierten Proteine enthalten keine H-Domäne und besitzen auch keine typischen Schnittstellen. Proteine, die ein SP dieses Typs besitzen, sind bisher nur in *B. subtilis* identifiziert worden (Meima und van Dijl, 2003).

1.2.2 Der Sec-Translokationsweg

Durch den Sec-Translokationsweg werden in Bakterien die meisten Proteine exportiert. Am besten beschrieben ist der hochkonservierte Sec-Translokationskomplex von *E. coli* (Oliver and Beckwith, 1982) und *B. subtilis* (Sadaie *et al.*, 1991; Takamatsu *et al.*, 1992).

Die Proteintranslokation ist ein mehrstufiger Prozess, in dem die Proteinvorläufer an den Translokationsapparat transportiert werden müssen, um anschließend transloziert und prozessiert zu werden (Abb. 1.3).

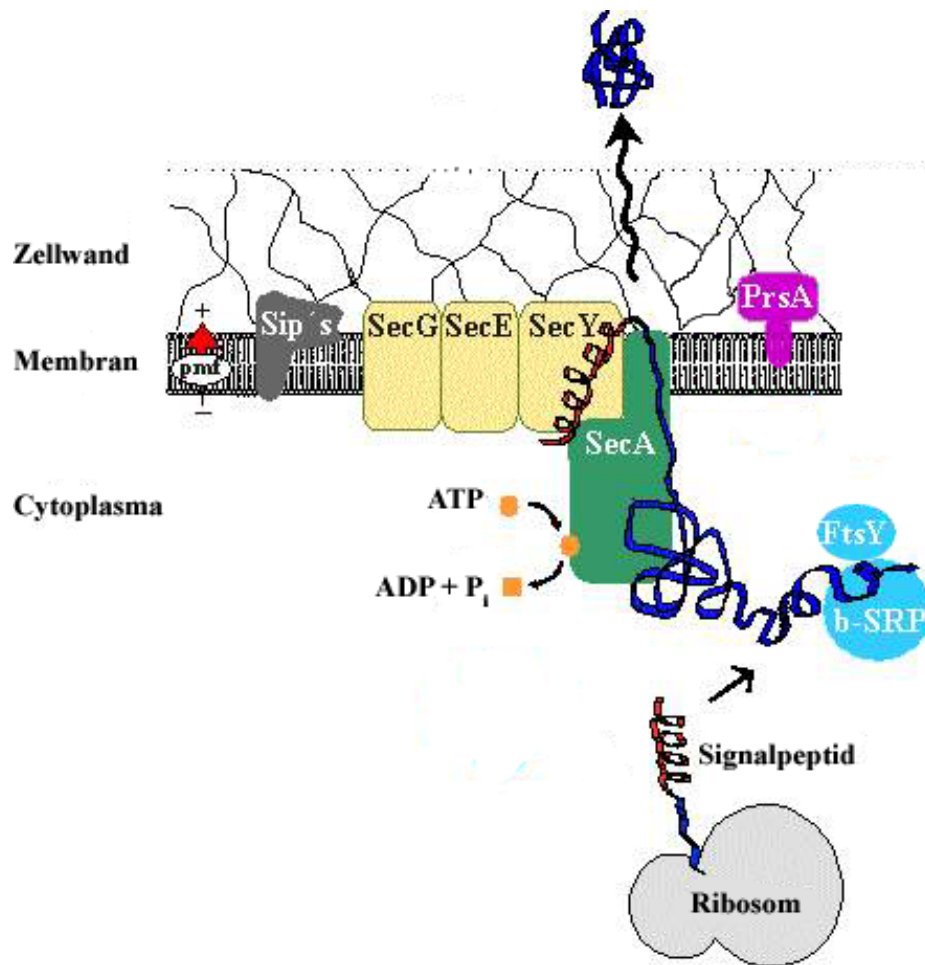


Abb. 1.3: Der Sec-Translokationsweg.

Zu sekretierende Proteine werden am Ribosom synthetisiert und bilden mit dem Signal Recognition Particle (SRP) und FtsY noch während der Translation einen Komplex, der an den SecYEG-Kanal bindet. Durch ATP-Verbrauch und den Protonengradienten wird das Präprotein von SecA durch die Membran und Zellwand transloziert. Nach oder während der Translokation entfernt eine Signalpeptidase (Sip) das Signalpeptid. Nach erfolgter Translokation wird das reife Protein durch Chaperone wie PrsA in die native Form gefaltet (Abbildung modifiziert nach <http://www.kfa-juelich.de/ibt/protsec/grundlagen.html>).

In der ersten Stufe binden die in der Synthese befindlichen Proteine an das Signal Recognition Particle (SRP), einen Ribonukleoproteinkomplex (für Übersichtsartikel siehe: Herskovits *et al.*, 2000), der eine Faltung verhindert, da die meisten Proteine ungefaltet über Membran und Zellwand transloziert werden. Das SRP erkennt die N-terminale Signalsequenz in den frühen Stadien der Translation, bindet an die wachsende Proteinkette und an das Ribosom und komplexiert anschließend mit dem SRP-Rezeptor FtsY (Ribosome-nascent chain; RNC-Komplex). Der gesamte Komplex interagiert daraufhin mit dem Translokationskanal SecYEG (Meima und van Dijl, 2003). Nach Bindung von GTP an FtsY und SRP wird der RNC-Komplex aufgelöst und das Protein wird co-translationell durch den SecYEG-Kanal transloziert (Meima und van Dijl, 2003). Hierbei bindet der Translokationsmotor SecA an das SP.

ATP-Verbrauch und der Protonengradient über die Membran liefern die Energie für konformationelle Änderungen, die das zu sekretierende Protein durch den Kanal 'schieben' (Schiebel *et al.*, 1991; van der Wolk *et al.*, 1993; van der Wolk *et al.*, 1995).

Während oder kurz nach der Translokation wird das SP durch eine SPase der Klassen I oder II geschnitten, wobei das SP durch Signalpeptid-Peptidasen (SPPasen) abgebaut wird (Meima und van Dijl, 2003).

Nach der Translokation wird das Protein schnell mit Hilfe von Chaperonen in die native Form gebracht, da außerhalb der Zelle ungefaltete Proteine einem raschen Abbau durch Proteasen ausgesetzt sind. Wichtigstes Chaperon für die Faltung ist die cis/trans-Isomerase PrsA (Kontinen *et al.*, 1991; Kontinen and Sarvas, 1993; Jacobs *et al.*, 1993). Weitere für die Faltung notwendige Metallionen wie Ca^{2+} oder Fe^{3+} werden den Proteinen aus der Zellwand zugeführt, die aufgrund der negativen Gesamtladung ein Reservoir für diese Ionen darstellt (Petit-Glatron *et al.*, 1993).

In neueren Untersuchungen wurden in *Mycobacterium tuberculosis* zwei unterschiedliche Gene für SecA gefunden (Braunstein *et al.*, 2001). Auch in *L. monocytogenes* gibt es zwei Gene für die Translokationsuntereinheit. SecA1 (Lmo2510) und SecA2 (Lmo0583) translozieren aber unterschiedliche Proteine (Lenz and Portnoy, 2002; Lenz *et al.*, 2003).

1.2.3 Sec-unabhängige Proteinsekretion

Der Twin-Arginin Translokationsweg (Tat)

Der ΔpH -abhängige Twin-Arginin Translokationsweg (Tat) wurde zuerst in Pflanzenchloroplasten entdeckt (Mould *et al.*, 1991; Robinson *et al.*, 1994; Chaddock *et al.*, 1995) und scheint in den meisten Bakterien zu existieren (Meima und van Dijl, 2003). Im Gegensatz zum Sec-Translokationsweg können durch den Tat-Sekretionsweg auch Proteine in ihrer nativen Form transloziert werden.

Der Aufbau der Tat-Maschinerie ist noch nicht völlig verstanden, aber vermutlich bilden mehrere Kopien von je TatA/E und TatB durch ihre einzelnen Transmembrandomänen einen Kanal, in dem TatC die Signalpeptid-bindende Komponente ist (Jongbloed *et al.*, 2000; Berks *et al.*, 2000).

Durch Homologievergleiche sind bisher nur TatA (Lmo0362) und TatC (Lmo0361) im Genom von *L. monocytogenes* identifiziert.

Der Pseudopilin-Translokationsweg

Präproteine, die durch den Pseudopilinsekretionsweg exportiert werden, besitzen auch ein SP des Sec-Translokationswegs. Die einzigen bekannten Proteine von *B. subtilis*, die durch den Pseudopilinweg transloziert werden, sind ComGC, ComGD, ComGE und ComGG, welche alle für DNA-Bindung und den Transport im Verlauf der genetischen Kompetenz benötigt werden (Tjalsma *et al.*, 2000). Prozessiert werden die ComG-Proteine durch ComC, einer vermutlichen SPase. Außer ComC sind wahrscheinlich die ATPase ComGA und die Membranproteine ComGB und ComGF für den Export und den Aufbau der vier ComG-Pseudopiline in *B. subtilis* notwendig (Chung *et al.*, 1998).

Das Genom von *L. monocytogenes* kodiert für folgende Com-Proteine: ComGG (Lmo1341), ComGF (Lmo1342), ComGE (Lmo1343), ComGD (Lmo1344), ComGC (Lmo1345), ComGB (Lmo1346), ComGA (Lmo1347), ComEC (Lmo1482), ComEB (Lmo1483), ComEA (Lmo1484), ComC (Lmo1550), ComK (Lmo2270), ComFC (Lmo2512), ComFA (Lmo2513).

Export über ABC-Transporter

Eine Gruppe von Proteinen, die über ABC-Transporter in Gram-positiven Bakterien exportiert werden, sind die Bakteriocine. Diese sind besonders gut für Lactobakterien und *B. subtilis* beschrieben worden. In *B. subtilis* sind für diese Funktion drei ABC-Transporter bekannt: für den Export von Sublancin werden SunT (Paik *et al.*, 1998), für den Export von Subtilin die Spa-Proteine (Chung *et al.*, 1992) und für den Export des anti-listeriellen Subtilosin AlbC (Zheng *et al.*, 1999) verantwortlich gemacht.

Der ESAT-6-Exportweg

Die Existenz eines ESAT-6-Translokationsweg für kleine Proteine wurde erst kürzlich für *Mycobacterium tuberculosis* beschrieben (Gey Van Pittius *et al.*, 2001; Pallen, 2002). Die Proteine der ESAT-6-Familie, die zumeist aus weniger als 100 AS aufgebaut sind, besitzen eine Homologie zum kleinen mycobakteriellen Protein ESAT-6. Dieses ist, wie auch andere Mitglieder der Familie, ein immunodominantes T-

Zell-Antigen (Skjot *et al.*, 2000). Bisher wurde erst ein mycobakterielles Protein vorgeschlagen (Rv3873), das am tatsächlichen Transport dieser Proteine beteiligt sein soll (Okkels and Andersen, 2004).

In *L. monocytogenes* gibt es ein Homolog der ESAT-6-Proteinfamilie, Lmo0061 (Pallen, 2002).

1.3 Die Oberflächen- und sekretorischen Proteine von *Listeria monocytogenes*

Das Genom von *Listeria monocytogenes* kodiert für eine große Anzahl von Oberflächenproteinen (Glaser *et al.*, 2001), die in folgende Gruppen aufgeteilt werden können: (i) Proteine, die durch ihren Carboxy-Terminus kovalent an die Zelloberfläche gebunden sind (LPXTG- und NXZTN-Proteine), (ii) Proteine, die über den C-Terminus nicht-kovalent gebunden sind (Proteine mit GW-Modulen, P60-ähnliche Proteine und Proteine mit hydrophobem Anker), (iii) Proteine, die über den N-Terminus gebunden sind (Lipoproteine), (iv) Proteine, die über Protein-Protein-Interaktionen an die Zelloberfläche gebunden sind und (v) Proteine, die kein Zellwandretentionssignal besitzen (sekretorische Proteine) (Cabanès *et al.*, 2002).

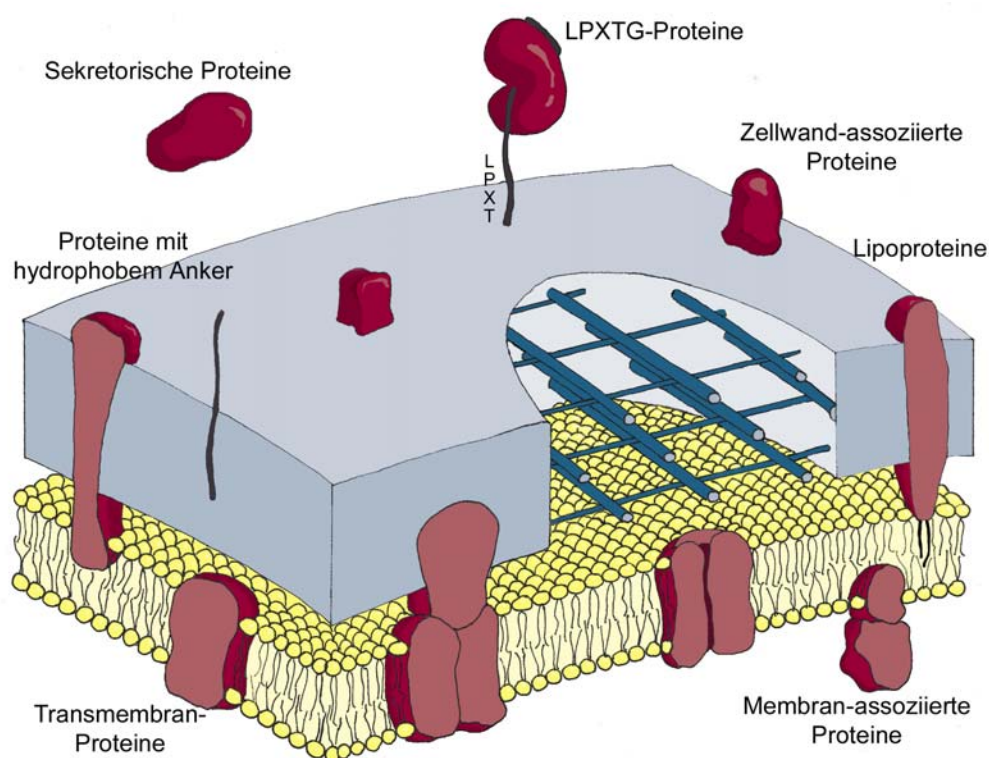


Abb. 1.4: Die Oberflächenproteine von *Listeria monocytogenes* und ihre Verankerung an die Zellwand (Baumgärtner, 2004).

LPXTG-Proteine

Die bekanntesten Proteine von Gram-positiven Bakterien, die kovalent an die Zelloberfläche gebunden werden, tragen ein so genanntes C-terminales LPXTG-Sorting ('Sortierungs')-Signal (Fischetti *et al.*, 1990). Das Signal besteht aus einer größtenteils konservierten LPXTG-Aminosäure-Sequenz, wobei X jede beliebige Aminosäure sein kann und einzelne AS-Positionen (1, 4 oder 5 der kanonischen Sequenz) variieren können (Navarre and Schneewind, 1999). Gefolgt wird diese Sequenz von einer ca. 20 Aminosäuren langen hydrophoben Domäne und einer Region von positiv-geladenen Aminosäuren. Nach der Sec-abhängigen Sekretion verbleibt das Protein durch das Sorting-Signal zuerst in der Membran. Anschließend wird das zu verankernde Protein durch das membrangebundene Enzym Sortase A (Mazmanian *et al.*, 1999) zwischen den Threonin- und Glycin-Resten geschnitten und der Threoninrest kovalent an die meso-Diaminopimelinsäure von Zellwandvorläufermolekülen gebunden (Dhar *et al.*, 2000) (Abb. 1.5).

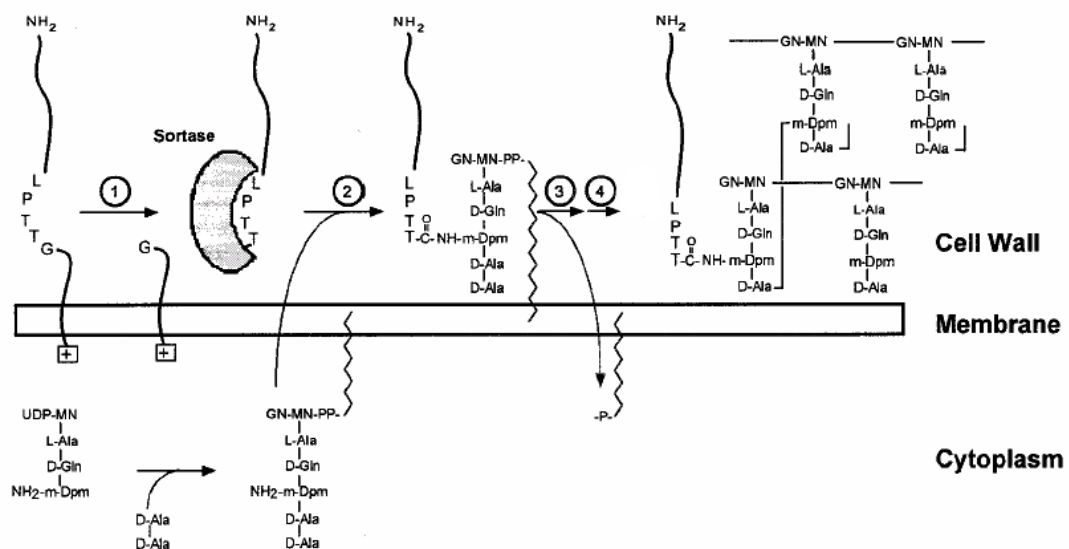


Abb. 1.5: Modell der Funktion der Sortase A in *Listeria monocytogenes*.

Sortase A schneidet LPXTG-Proteine zwischen dem Threonin (T) und Glycin (G) (1) und bindet anschließend das Threonin an die meso-Diaminopimelinsäure der Zellwandvorläufermoleküle (2). Dieses Zwischenprodukt wird dann durch eine Transglycosylase (3) und eine Transpeptidase (4) in die Zellwand eingebaut. (Dhar *et al.*, 2000).

Für LPXTG-Proteine kodierende Gene wurden in vielen Gram-positiven Bakterien gefunden. *Listeria monocytogenes* besitzt jedoch eine größere Anzahl an LPXTG-Proteinen als jedes andere sequenzierte Bakterium. So kodiert das Genom von *Listeria monocytogenes* für 41 solcher Proteine, während man bei *L. innocua* 31 (Glaser *et al.*, 2001), *Staphylococcus aureus* 17 (Kuroda *et al.*, 2001), *Streptococcus*

pyogenes 13 (Ferretti *et al.*, 2001), *Streptococcus pneumoniae* 11 (Tettelin *et al.*, 2001) und *Bacillus subtilis* nur eines findet (Kunst *et al.*, 1997).

11 der 41 LPXTG-Proteine (26,8%) in *L. monocytogenes* sind nicht vorhanden in *L. innocua*, und man geht davon aus, dass sie die Teilgruppe mit der höchsten Spezifität für die pathogene Art darstellen und daher einen beträchtlichen Anteil an der pathogenen Lebensweise von *L. monocytogenes* haben (Cabanes *et al.*, 2002). So ist es auch nicht verwunderlich, dass zu den LPXTG-Proteinen auch fünf Internaline (InlA, InlE, InlF, InlG, InlH) und 14 Internalin-ähnliche Proteine gehören (Glaser *et al.*, 2001).

Zusätzlich zur Sortase A wurden in *S. aureus* (Mazmanian *et al.*, 2002) und in *L. monocytogenes* je eine weitere Sortase (SrtB) beschrieben (Bierne *et al.*, 2004). SrtB katalysiert vermutlich die Bindung des Oberflächenproteins SvpA an das Peptidoglycan an einem NXZTN-Motiv (Bierne *et al.*, 2004). Weitere Proteine, die von SrtB an die Zellwand gebunden werden, wurden bisher nicht identifiziert.

GW-Module

Als GW-Module bezeichnet man eine Wiederholungssequenz von ca. 80 hydrophoben Aminosäuren am Carboxy-Terminus von bakteriellen Proteinen, die das Dipeptid Glycin-Tryptophan (GW) enthalten. Diese Module halten die Proteine durch Interaktion mit der Lipoteichonsäure in der bakteriellen Zellwand (Jonquieres *et al.*, 1999). Aufgrund der nicht-kovalenten Verankerung lösen sich Proteine mit GW-Modulen leicht aus der Zellwand und werden auch in beträchtlicher Menge im Kulturüberstand gefunden. Das Genom von *L. monocytogenes* kodiert für 9 Proteine mit GW-Modulen, darunter auch InlB.

Hydrophobe Anker

11 Proteine von *L. monocytogenes* werden über so genannte hydrophobe Anker in der Zellmembran verankert, darunter das Aktin-Nukleationsprotein ActA. Die Proteine enthalten eine hydrophobe C-terminale Domäne, der eine Reihe von positiv-geladenen Aminosäure-Resten folgt. Man geht davon aus, dass diese Aminosäure-Reste als Stop-Signal für den Transport über die Membran dienen (Domann *et al.*, 1992).

P60-ähnliche Proteine

Das 60 kDa große Protein P60 (Iap) ist ein in großen Mengen exprimiertes Zellwandprotein. Es hat eine Mureinase-Aktivität und war das erste Protein, für das eine mögliche Funktion bei der Invasion von Wirtszellen beschrieben wurde (Kuhn and Goebel, 1989). Diese Proteine enthalten LysM-Domänen, die häufig in bakteriellen Proteinen mit Zellwandabbaufunktion gefunden werden und vermutlich auch für die Bindung an das Peptidoglycan verantwortlich sind. In *L. monocytogenes* gibt es vier P60-ähnliche Proteine.

Lipoproteine

Bakterielle Lipoproteine besitzen ein spezifisches Signalpeptid. Durch die Diacylglyceryl-Transferase (Lgt) wird eine N-Acyl-Diglyceridgruppe eines Glycerophospholipids an die Thiolgruppe des im Signalpeptids enthaltenen Cysteins gebunden. Anschließend prozessiert die Signalpeptidase II (Lsp) diese Prälipoproteine in reife Lipoproteine, die durch ihre Lipidkette in der Membran verbleiben und ihren Proteinanteil auf der Bakterienoberfläche präsentieren. *L. monocytogenes* besitzt 68 vorhergesagte Lipoproteine.

Sekretorische Proteine

Sekretorische Proteine sind Proteine, die ihre Funktion in dem die Bakterien umgebenden Medium erfüllen. Für *Listeria monocytogenes* wurden bei der Genomsequenzierung durch das Programm SignalP 86 Proteine als sekretiert vorhergesagt. Da die momentan verfügbaren Programme aber nur die Sec-abhängige Sekretion berücksichtigen, ist von mehr sekretierten Proteinen auszugehen. Prominenteste Beispiele für sekretierte Proteine sind Listeriolysin (Hly), PlcA, PlcB, die Metalloprotease Mpl und InlC.

1.4 Listerielle Wirtszell-Pathogen-Interaktionen

Während die primären Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* bereits gut charakterisiert sind, für einige listerielle Oberflächenproteine wie InlA, InlB und ActA sogar die Interaktionspartner der Wirtszelle und der jeweilige Wirkungsmechanismus größtenteils bekannt sind, ist die unmittelbare Wirtszellantwort auf listerielle Invasion und Infektion kaum untersucht. Einzig mittels Transkriptomanalysen wurde bisher die Wirtszellantwort auf listerielle Infektion untersucht (Cohen *et al.*, 2000; Baldwin *et al.*, 2003).

Im folgenden sind zwei entscheidende Schritte der listeriellen Infektion und der Interaktion mit dem Wirt, die Invasion und die intrazelluläre Fortbewegung, beschrieben.

1.4.1 Mechanismus der listeriellen Invasion

Die ersten Schritte des Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes* stellen die Adhäsion und die Induktion der Phagozytose bei nicht obligat phagozytierenden Zellen dar (Abb. 1.1). *Listeria monocytogenes* interagiert je nach Wirtszellart über InlA oder InlB mit bestimmten wirtszelleigenen Rezeptoren und leitet somit einen Phagozytose-ähnlichen Prozess ein. InlA-vermittelte Internalisierung ist auf Epithelzellen begrenzt und vermutlich hauptsächlich für die Überwindung des Darmepithels von Bedeutung (Gaillard *et al.*, 1991; Bierne and Cossart, 2002a). InlB wiederum ist für die Internalisierung in ein breites Spektrum von Zellen wie Hepatozyten, Epithel- und Endothelzellen verantwortlich (Dramsı *et al.*, 1995; Lingnau *et al.*, 1995; Greiffenberg *et al.*, 1998; Parida *et al.*, 1998).

InlB gehört zur Familie der Internaline, der 24 Proteine zugeordnet werden (Glaser *et al.*, 2001). Es hat eine molekulare Masse von 67 kDa und ist das einzige Internalin, das über so genannte GW-Module an die Lipoteichonsäure der listeriellen Zellwand gebunden ist. Im restlichen Aufbau ist es jedoch den anderen Internalinen sehr ähnlich. Nach der N-terminalen Signalsequenz folgen 7 Leucin-reiche Wiederholungssequenzen (Leucine-rich Repeats, LRR), eine Immunoglobulin-ähnliche Region (IR), das verlinkende, sehr bewegliche B-Segment und die drei GW-Module (Schubert *et al.*, 2001).

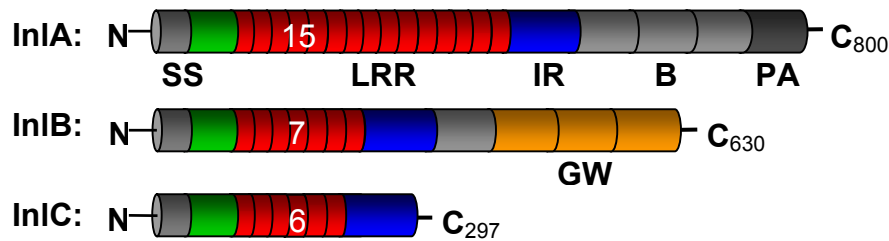


Abb. 1.6: Beispielhaft für die drei unterschiedlichen Klassen der Internaline der schematische Aufbau der Internaline A, B und C aus *L. monocytogenes*.

InIA wird wie alle anderen Internaline außer InIB und InIC über ein LPXTG-Motiv an die Zellwand gebunden. InIB wird über GW-Module verankert und InIC ist das einzig bekannte sekretierte Internalin.

Homologe Domänen sind gleichfarbig dargestellt. SS, Signalsequenz; LRR, Leucine-rich Repeats mit Anzahl der LRR-Motive; IR, Immunoglobulin-ähnliche Region; B, B-Segmente; PA, Peptidoglycan-Anker (LPXTG-Motiv); GW, GW-Module (Machner, 2002).

Die LRR-Domäne ist notwendig für die Funktionalität von InIA und InIB, was durch Internalisierungsexperimente mit den LRR-Domänen von InIA bzw. InIB beschichteten Latex-Beads gezeigt werden konnte (Lecuit *et al.*, 1997; Braun *et al.*, 1998). Neuere Untersuchungen halten auch die GW-Domäne von InIB für eine erfolgreiche Internalisierung für essentiell (Banerjee *et al.*, 2004).

Für InIA und InIB sind die jeweiligen Interaktionspartner der Wirtszellen bekannt. InIA induziert die Phagozytose durch Bindung an E-Cadherin, ein Adhäsionsmolekül zwischen Zell-Zell-Kontakten von Säugerepithelzellen (Mengaud *et al.*, 1996). InIB wiederum bindet an den Hepatocyte Growth Factor-Rezeptor (HGF-R) Met (Shen *et al.*, 2000) und vermittelt so eine Phagozytose durch einen so genannten Zipper-('Reisverschluss')-Mechanismus (Lecuit *et al.*, 1997). Als weiterer Interaktionspartner, der die Met-gestützte Aufnahme verstärken könnte, wurde gC1q-R vorgeschlagen (Braun *et al.*, 2000). Neuere Untersuchungen widerlegten jedoch eine Beteiligung von gC1q-R an der listeriellen Invasion (Banerjee *et al.*, 2004).

Met ist ein Heterodimer bestehend aus einer extrazellulären, 45kDa großen α - und einer membranspannenden, 145 kDa großen β -Untereinheit. Letztere enthält die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne (Furge *et al.*, 2000). Bei extrazellulärer Aktivierung werden spezifische, im Cytosol gelegene Tyrosinreste (Tyr1349 und Tyr1356) autophosphoryliert. Nach Phosphorylierung können Gab1, Grb1 und PI 3-kinase sowie andere Kinasen an den intrazellulären Teil von Met binden und weitere Signalwege aktivieren (Ponzetto *et al.*, 1994; Lee and Yamada, 1995; Weidner *et al.*, 1996).

Met, der sich erst spät in der Evolution entwickelte und nur in Vertebraten vorkommt, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von vielen Prozessen wie Entwicklung

und Gewebserneuerung. Bindung des natürlichen Liganden HGF an Met verursacht außerdem eine Reihe von anderen zellulären Prozessen wie Proliferation und Aktivierung anti-apoptotischer Signalwege (Abbildung 1.7). Epithelzellen, insbesondere MDCK-Zellen antworten auf HGF-Stimulation mit 'Scattering', einem Auseinandermigrieren der Zellen, weshalb HGF auch als 'Scatter Factor' bezeichnet wird. In Krebszellen ist Met häufig überexprimiert und dient als Marker. Auch bei der Ausbreitung von Krebszellen spielt Met eine wichtige Rolle (für Referenzen siehe: (Birchmeier *et al.*, 2003).

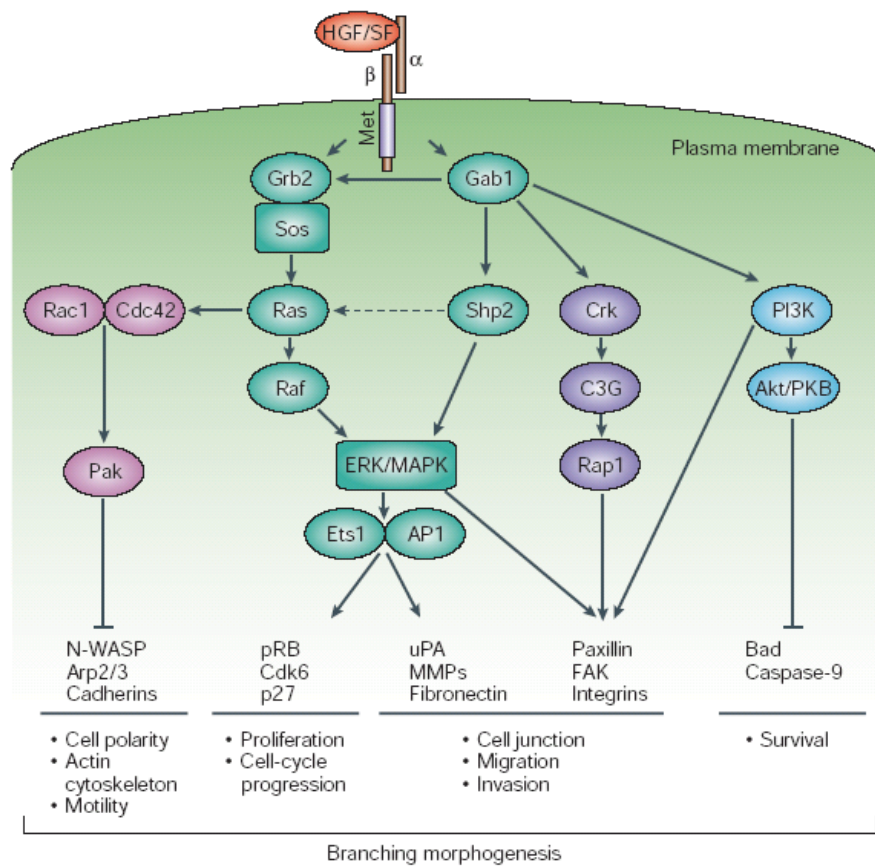


Abb. 1.7: HGF-vermittelte Signalwege.

Aktivierung von Met führt zu einer Rekrutierung von Grb2 und Gab1. Über Grb2 können die Ras- bzw. der Rac/Cdc42-Signalwege aktiviert werden, die zu Proliferation bzw. Aktin-Cytoskeletumbau führen. Die Aktivierung von Gab1 kann auch zu Zellmigration (über die ERK/MAPK-Kaskade), sowie Anti-Apoptose (über PI3K) führen (Birchmeier *et al.*, 2003).

Untersuchungen der Wirtszellantwort auf die Bindung von InIB an Met ergaben (Abb. 1.8), dass lösliches InIB ebenso wie HGF Membran-Kräuslung ('Ruffling') und 'Scattering' induziert. Des weiteren wurde nach InIB-Stimulation Tyrosinphosphorylierung von verschiedenen Adapterproteinen wie Gab1, Cb1 und Shc, sowie Phosphoinositol (PI) 3-kinase festgestellt (Ireton *et al.*, 1999). Trotz der ähnlichen Aktivierung von Signalwegen besitzen InIB und HGF jedoch keine

strukturelle Homologie und binden an unterschiedliche Regionen des gemeinsamen Rezeptors (Shen *et al.*, 2000). Auch ist die InIB-vermittelte Phosphorylierung von Met transients (Maximum nach 5-10 min) als eine HGF-Aktivierung, die erst nach 2 h nachlässt.

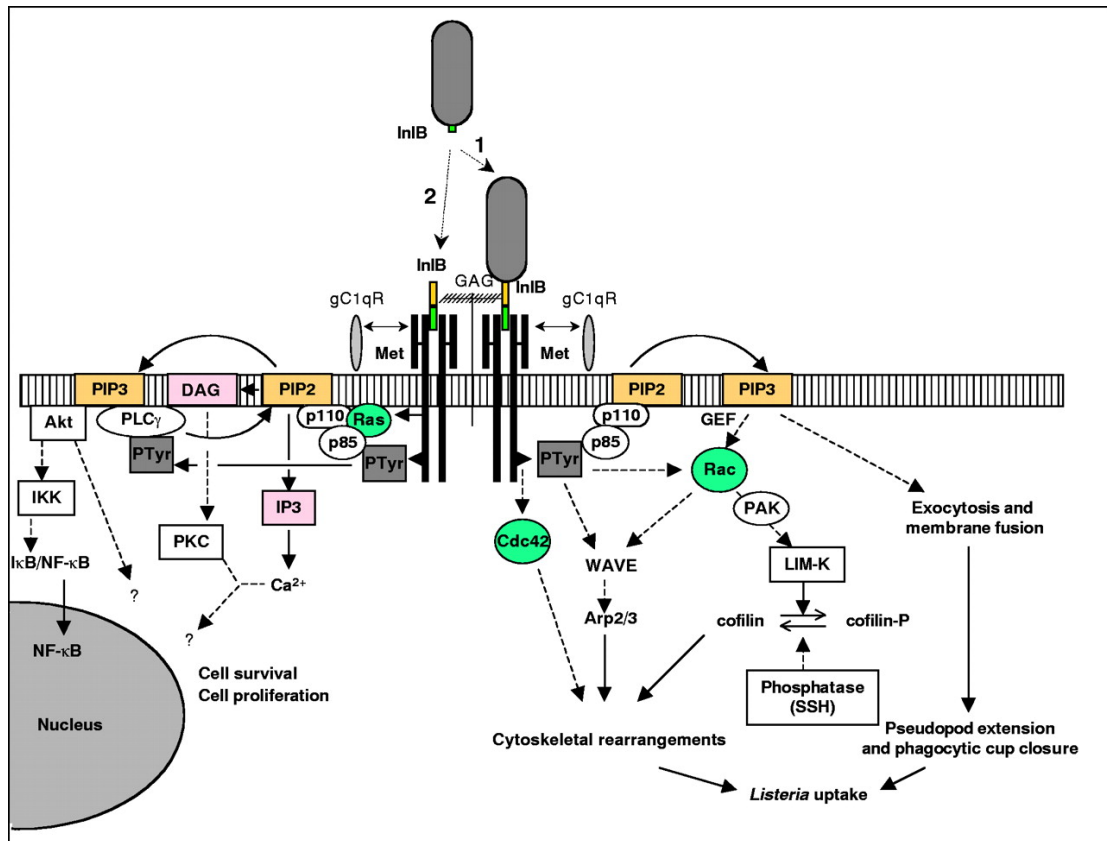


Abb. 1.8: InIB-vermittelte Signalwege.

Aktivierung von Met durch InIB führt über den Rac- und den Cdc42-Weg zu Veränderungen des Cytoskeletts, die zur Aufnahme von *Listeria* führen. Des Weiteren werden Rac und PI-3-Kinase aktiviert, was vermutlich zu Zellproliferation und anti-apoptotischen Signalen führt (Bierne and Cossart, 2002a). Gestrichelte Linien kennzeichnen hypothetische Schritte.

L. monocytogenes wird nach Bindung von InIB an Met, das den Rac- und Cdc42-Signalweg aktiviert, phagozytiert (Bierne *et al.*, 2001). Daraufhin rekrutiert vermutlich die GTPase Rac ein Protein der WASP-Familie, Wave, das wiederum den Arp2/3-Komplex aktivieren kann (Eden *et al.*, 2002). Weitere beteiligte Proteine sind Cofilin, die PI-3-Kinase, PAK- und LIM-Kinase (Cossart *et al.*, 2003).

Mit einem ähnlichen Mechanismus wie *Listeria* verschafft sich auch *Yersinia pseudotuberculosis* Eintritt in die Zelle. Durch Bindung mit dem Oberflächenprotein Invasin an Integrin-Rezeptoren werden intrazelluläre Kinasen an Tyrosinen phosphoryliert und der Aktincytoskelettumbau eingeleitet (für Übersichtsartikel siehe:

Cossart and Sansonetti, 2004). Die Interaktion zwischen bakteriellen Oberflächenproteinen und wirtszelleigener Rezeptortyrosinkinasen stellt also einen wichtigen Mechanismus für die Internalisierung von Pathogenen dar.

1.4.2 Mechanismus der intrazellulären Fortbewegung

L. monocytogenes besitzt als intrazelluläres Pathogen die ungewöhnliche Eigenschaft, sich durch Polymerisation von wirtseigenem Aktin im Cytosol der Wirtszelle fortzubewegen. Diese Art der Fortbewegung findet man auch bei anderen intrazellulären Pathogenen, die nicht mit *L. monocytogenes* verwandt sind, wie z.B. bei *Shigella flexneri* (Bernardini *et al.*, 1989) und *Rickettsia spp.* (Heinzen *et al.*, 1993). Aus der Gattung *Listeria* ist außer *L. monocytogenes* einzig *L. ivanovii* in der Lage, sich durch Aktinpolymerisation fortzubewegen (Karunasagar *et al.*, 1993). Einen ähnlichen Mechanismus der Aktinpolymerisation findet man auch in den Lamellipodien von motilen Zellen, wie zum Beispiel bei Neutrophilen, die zum Infektionsherd wandern.

Der listerielle Faktor, der zur Polymerisation des Aktins der Wirtszelle nötig und ausreichend ist, ist das Oberflächenprotein ActA (Domann *et al.*, 1992; Kocks *et al.*, 1992). *actA*-Deletionsmutanten können sich nicht mehr intrazellulär fortbewegen und bilden charakteristische Mikrokolonien in der Nähe des Zellkerns (Kocks *et al.*, 1992). Da sie nicht mehr in der Lage sind, sich von Zelle zu Zelle auszubreiten, sind sie avirulent.

ActA ist ein 639 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von 67 kDa. Es wird von dem im Virulenzgencluster gelegenen Gen *actA* kodiert, das durch PrfA positiv reguliert wird. ActA besitzt eine Signalsequenz für den Transport aus der Bakterienzelle und enthält am C-Terminus eine hydrophobe Region, mit der es in der Bakterienmembran verankert ist. Auf der Oberfläche beweglicher Listerien ist ActA überall zu finden, zeigt jedoch eine polare Verteilung mit der höchsten Konzentration an dem Bakterienpol, an dem die Bildung des Aktinschweifs erfolgt (Kocks *et al.*, 1993). ActA ist dabei ausschließlich auf der bakteriellen Oberfläche, nicht aber im Aktinschweif nachweisbar (Kocks *et al.*, 1993; Niebuhr *et al.*, 1993).

Wie es zu einer polaren Verteilung von ActA an der Zelloberfläche kommt, wurde lange diskutiert. Die Gruppe um Pascale Cossart veröffentlichte Daten, die nahe legen, dass ActA polar auf der Bakterienoberfläche verteilt ist, mit einer höheren

Konzentration an einem Pol des Bakteriums (Kocks *et al.*, 1993; Cossart and Kocks, 1994), während Niebuhr *et al.* hierfür keine Anzeichen sahen und eine gleichmäßige Verteilung propagierten (Niebuhr *et al.*, 1993). Bindung eines ActA-Fusionsproteins an die Oberfläche von *Streptococcus pneumoniae* wie auch Latexkügelchen (Cameron *et al.*, 1999) löste an der gesamten Oberfläche Aktinpolymerisation aus, die aber zu keiner Fortbewegung führte. Erst nach Teilung der Streptokokken entstand eine polare Verteilung von ActA und Fortbewegung trat ein (Smith *et al.*, 1995). Auch intrazelluläre Listerien müssen sich erst teilen, bevor sie sich durch Aktinpolymerisation fortbewegen können (Robbins *et al.*, 1999). Erst die Zellteilung führt offensichtlich zu einer polaren Verteilung von ActA, die eine Fortbewegung in der Wirtszelle ermöglicht.

Die Aktinpolymerisation, die das Bakterium durch die Zelle schiebt, wird durch eine Bindung von ActA an den Arp2/3-Komplex induziert (Welch *et al.*, 1998). Hierbei imitiert es vermutlich die Funktion der WASP-(Wiscott-Aldrich-Syndrom Proteine) Proteine, welche die katalytische Funktion des Arp2/3-Komplex verstärken (Loisel *et al.*, 1999; für Übersichtsartikel siehe: Stradal *et al.*, 2004). Außerdem bindet ActA an eine ganze Reihe von weiteren Wirtszellproteinen, u.a. an die Ena/VASP-Proteine (Chakraborty *et al.*, 1995; Gertler *et al.*, 1996; Niebuhr *et al.*, 1997).

LaXp180 und Stathmin

An dem Bakterienpol, der nicht Aktin polymerisiert, bindet ActA an das Wirtszellprotein LaXp180 (Pfeuffer *et al.*, 2000). LaXp180 ist ein Protein von ca. 180 kDa, das seinen Namen von der Kreuzreaktivität mit dem Protein La erhielt (Pfeuffer *et al.*, 2000). Es enthält eine Coiled-Coil-Region, einen Leucine-Zipper und eine „Nuclear Localisation Sequence“ (NLS). Für die Aminosäuresequenz von LaXp180 gibt es mehrere Einträge in der NCBI-Datenbank. So wurde das Protein u.a. als Transkriptionsfaktor RB1CC1 (Retinoblastoma-inducible 1 coiled-coil 1) (Chano *et al.*, 2002a) beschrieben, der - wenn inaktiviert - zu einer stark erhöhten Brustkrebswahrscheinlichkeit führt (Chano *et al.*, 2002b). Außerdem wurde es als das Pyk2-bindende Protein FIP200 (Ueda *et al.*, 2000) beschrieben, für das später eine inhibierende Wirkung auf die Focal Adhesion Kinase (FAK) gezeigt wurde (Abbi *et al.*, 2002).

Durch Kolokalisationsexperimente zeigten Pfeuffer *et al.*, dass ActA an dem Bakterienpol, der nicht Aktin polymerisiert, nicht nur mit LaXp180, sondern auch mit

Stathmin kolokalisiert (Pfeuffer *et al.*, 2000), für das schon früher eine Bindung zu LaXp180 gezeigt wurde (Maucuer *et al.*, 1995).

Stathmin, auch Op18 genannt, ist ein 17 kDa großes Phosphoprotein, das als verbindendes Relais (griech. Stathmos = Relais) für Signale vieler Zellfunktionen wie Proliferation und Differentiation vorgeschlagen wurde (Sobel, 1991). Es bindet an Tubulin und destabilisiert Mikrotubuli (Belmont and Mitchison, 1996). Mikrotubuli sind Proteinpolymerröhren aus α/β -Tubulindimeren, die am Aufbau der Mitotischen Spindel (Pearson and Bloom, 2004) und am Transport von Endosomen und Organellen (Mandelkow and Mandelkow, 2002) eine wichtige Rolle spielen.

Stathmin wird durch Phosphorylierung an vier möglichen Phosphorylierungsstellen (Ser16, Ser25, Ser38, Ser63) (Beretta *et al.*, 1993) durch eine Reihe von Kinasen deaktiviert (Marklund *et al.*, 1996; Di Paolo *et al.*, 1997; Andersen *et al.*, 1997; Melander *et al.*, 1997; Gradin *et al.*, 1998; Daub *et al.*, 2001) und spielt während des Zellzyklus eine wichtige Rolle (für Übersichtsartikel siehe: Andersen, 2000). In der Interphase ist es wenig phosphoryliert und wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (Larsson *et al.*, 1997) und Polo-like Kinasen (Budde *et al.*, 2001) beim Eintritt in die Mitose hyperphosphoryliert. Eine Progression durch den Zellzyklus benötigt Phosphorylierung aller vier Serine, die am Ende der Mitose wieder dephosphoryliert werden (Mistry and Atweh, 2001).

1.5 Entwicklungen in der Proteomforschung

Der Begriff Proteom entstand 1994 durch eine Kombination der Worte Protein und Genom durch den Doktoranden Marc Wilkins (Huber, 2003). Definiert wird das Proteom als die Proteinzusammensetzung einer abtrennbaren biologischen Fraktion zu einem bestimmten Zeitpunkt unter streng definierten Bedingungen. Während das Genom eines Organismus keinen bzw. wenigen Änderungen unterworfen ist, hat das Proteom eine sich ständig ändernde Proteinzusammensetzung. Deshalb ist die Reproduzierbarkeit des Zustandes, aus dem die Zellen bzw. Proteine entnommen werden, ein wichtiger Faktor für die Proteomforschung.

Eine Voraussetzung für erfolgreiche vergleichende Proteomuntersuchungen ist die Verfügbarkeit von mindestens zwei definierten Zuständen (z.B. krankes vs. gesundes Gewebe) und der genomischen Sequenz und damit der Proteinsequenzen des zu untersuchenden oder eines Art-verwandten Organismus. Daher werden Proteomics und Transkriptomics auch als Post-Genom- bzw. Funktionelle Genom-Analyse bezeichnet. Zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit sind mehr als 1000 Genome unterschiedlicher Organismen sequenziert oder in Bearbeitung (http://igweb.integrated_genomics.com/GOLD/) und bilden damit eine riesige Datenmenge, auf die die Funktionelle Genomanalyse zurückgreifen kann.

Die grundlegende Methode für die Analyse von Proteomen ist die zweidimensionale Gelelektrophorese, die eine isoelektrische Fokussierung mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese kombiniert (O'Farrell, 1975; Klose, 1975). Hiermit können bis zu 10.000 verschiedene Proteinformen aufgetrennt (Klose, 1999) und anschließend über Massenspektrometrie (MS) identifiziert werden. Zusätzlich hat sich in den letzten Jahren die mit der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) gekoppelte Electrospray Massenspektrometrie etabliert, womit sich weniger komplexe Proteingemische (<1000 Proteine) schnell analysieren lassen.

Der entscheidende Schritt in Richtung Proteomforschung war die Entwicklung von hoch-sensitiven und hochauflösenden Massenspektrometern mit 'weichen' Ionisierungen wie MALDI-TOF (Karas and Hillenkamp, 1988; Tanaka *et al.*, 1988) und Electrospray Q-TOF (Fenn *et al.*, 1989) für die John Fenn und Koichi Tanaka 2002 den Nobelpreis erhielten. Diese Ionisierungsmethoden werden momentan fast ausschließlich mit Ionenfallen, Flugzeit- (Time-of-Flight, TOF), Quadrupol- oder

Fourier-Transform Ionen-Cyclotronenresonanz (FT-ICR) Massenspektrometern verbunden. Diese Massenspektrometer werden je nach Anforderungen sowie ihrer spezifischen Fähigkeiten einzeln für MS oder durch Reihenschaltung für Tandem-MS benutzt.

Die Entwicklungen der letzten Jahre führten zu einer sehr hohen Massenauflösung (FT-ICR: Auflösung ~ 500.000) und einer sehr schnellen Analysenzeit (Ionenfallengeräte: mehrere tausend Spektren pro Stunde). Des weiteren sind heutzutage durch Verbesserung der Detektoren und der Elektronik Attomolmengen (10^{-18} mol) von Proteinen standardmäßig identifizierbar.

MALDI TOF Massenspektrometrie

In der MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) Massenspektrometrie (Abb. 1.9) wird das Probenmaterial in eine organische, aromatische Säure (zumeist Dihydrobenzoe- oder α -cyano-Hydroxymizinsäure) unter Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA) oder Ameisensäure eingebettet. Ein wenige Nanosekunden kurz gepulster Laserstrahl wird auf die Matrix gerichtet, wodurch es an der Stelle zu einer explosionsartigen Verdampfung von Matrix und Probe kommt. In der energiereichen Gaswolke werden die Peptide durch Protonentransfer von Säuremolekülen ionisiert. Hierbei werden stark basische Reste bevorzugt, weshalb Arginin-enhaltende Peptide eine bessere Ionisierungseffizienz besitzen. Durch ein angelegtes elektrisches Feld werden die ionisierten Peptide beschleunigt, bis sie in eine feldfreie Region des Massenspektrometers (Flugrohr) gelangen. Da die fast ausschließlich einfach-geladenen Peptidionen vom gleichen elektrischen Feld beschleunigt wurden, haben die Peptide im Flugrohr alle die gleiche kinetische Energie, besitzen aber durch ihre unterschiedlichen Massen unterschiedliche Geschwindigkeiten und werden nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt. Die Massenbestimmung erfolgt durch Bestimmung der Zeit, die die Ionen nach der Ionisierung zum Durchqueren des Flugrohrs benötigen.

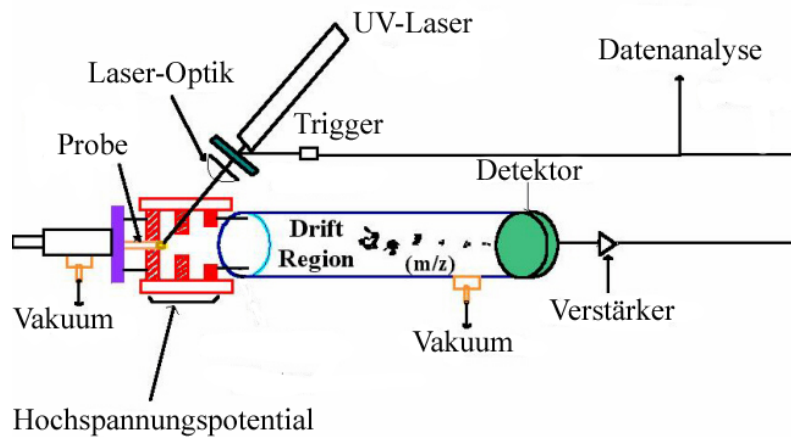


Abb. 1.9: Schematischer Aufbau eines MALDI TOF Massenspektrometers.

Peptide sind in eine organische Matrix eingebettet und werden durch einen gepulsten Laserstrahl verdampft. In der Gasphase werden die Peptide protoniert und durch ein angelegtes Spannungspotential beschleunigt, bis sie in eine feldfreie Drift-Region kommen. Hier trennen sich die Peptide nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis auf. Durch Berechnung der Zeit, die die Peptide zum Durchqueren des Flugrohres brauchen, wird die Masse berechnet.

Für die Proteinidentifikation mittels MALDI TOF MS wird sehr häufig das Peptidmassenfingerprint-Verfahren (Peptide Mass Fingerprint, PMF) verwendet. Hierbei werden die Massen der Peptide eines Proteins nach spezifischer Spaltung durch eine Protease, zumeist Trypsin, gemessen. Durch Vergleich mit einem theoretischen Verdau aller Proteine des Genoms kann eine Wahrscheinlichkeit berechnet werden, inwieweit die Peptidmassen den Massen eines vorhergesagten Proteins entsprechen. Da für den PMF vereinzelt Proteine benötigt werden, wird diese Methode fast ausschließlich für Proben aus 2D-Gelen verwendet. Durch die Entwicklungen der letzten Jahre können die Messungen automatisiert durchgeführt werden, weshalb die MALDI TOF MS die Methode der Wahl für einen Hochdurchsatz nach 2D-Gelelektrophorese ist.

Nano-Electrospray Q-TOF Massenspektrometrie

Bei der Elektrospray-Ionisierung (ESI) liegen die Peptide in wässrig-saurer Lösung vor. Die Lösung wird in eine metallbeschichtete Nadel vor einer kleinen Öffnung (Cone) des Massenspektrometers gebracht. Durch ein angelegtes elektrisches Potential werden kleine Tropfen von der Flüssigkeit mit einer Flussrate von 100-300 nl/min aus der Nadel gedrückt. Durch Wärme und einen angelegten Gasfluss verdampft das Lösungsmittel des Tropfens und die Oberfläche schrumpft, bis er durch die elektrostatischen Kräfte in kleinere Tropfen dispergiert. Nachdem das

gesamte Lösungsmittel verdampft ist, verbleibt die Ladung auf den Peptiden. Die Peptidionen durchlaufen ein Quadrupol-Massenspektrometer (Abb. 1.10) und werden nachfolgend durch eine TOF-Einheit analysiert und an einer Multi-Channel-Plate (MCP) detektiert (MS-Mode). Wenn ein bestimmtes Peptid fragmentiert werden soll, wird die Masse im MS1 (Quadrupol) ausgewählt und das Ion durch Stöße gegen Argonatome in der Kollisionszelle energetisch zur Dissoziation angeregt. Nach Dissoziation des Peptides werden die Massen der daraus entstehenden Ionen im nachfolgenden MS2 (TOF) identifiziert (MS/MS-Mode). Die Peptide dissoziieren häufig zwischen den C- und N-Atomen der Amidbindungen in spezifische Ionen (b- und y-Ionen; siehe Abb. 1.11), aus deren Masse sich die Aminosäuresequenz der Peptide erkennen lässt. Selbst wenn das Genom des betreffenden Organismus nicht bekannt ist, lassen sich so Sequenzinformationen von Proteinen erhalten (*de novo*-Sequenzierung).

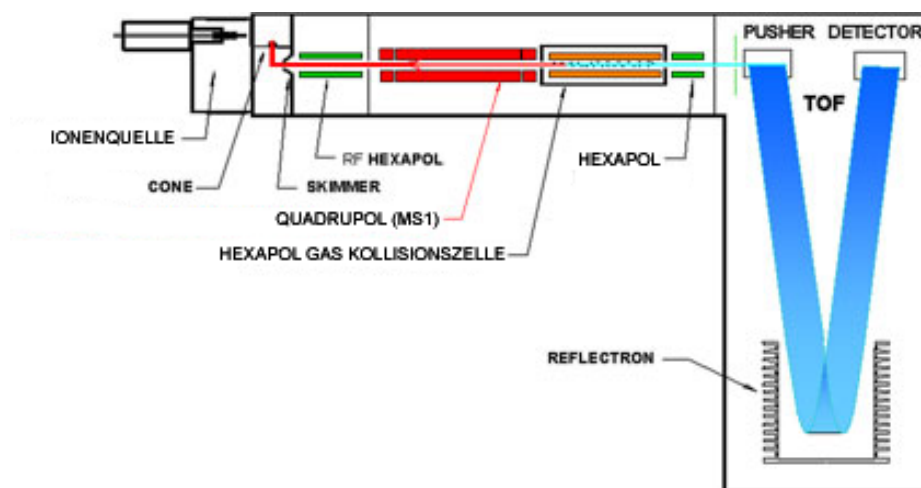


Abb. 1.10: Schematischer Aufbau eines Q-TOF Massenspektrometers.

Peptide werden durch eine Electrospray-Quelle ionisiert und durch einen Flugrohrmassenspektrometer detektiert. In der MS/MS-Einstellung werden im Quadrupol-Massenspektrometer (MS1) Ionen einer bestimmten Masse selektiert, die in der Hexapole-Gas-Kollisionszelle fragmentiert werden. Die Massen der Fragmente werden im Flugrohrmassenspektrometer (MS2) analysiert.

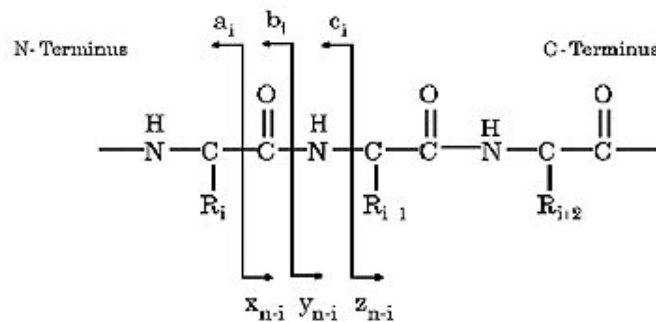


Abb. 1.11: Gebildete Peptidfragmente während Dissoziation in einem Q-TOF-Massenspektrometer.

Durch Stöße mit dem Kollisionsgas wird Energie auf die Peptidionen transferiert, die daraufhin dissoziieren können. Häufigste Dissoziation findet zwischen den Amidbindungen statt (b- und y-Serie). Bei höheren Energien werden auch a- und x- bzw. c- und z-Serien erhalten.

MALDI-TOF/TOF und die LIFT-Technologie

Eine dem Q-TOF ähnliche MS/MS-Methode gibt es seit kurzem auch für MALDI TOF Massenspektrometer. In dem Fall sind beide Massenspektrometer entweder aus TOF-Einheiten oder aus einer LIFT-Einheit und einem TOF-Massenspektrometer (Bruker) aufgebaut. Bei der LIFT-Technik (Suckau *et al.*, 2003) werden in der Ionenquelle durch starken Laserbeschuss (Laser-induced Dissociation, LID) oder durch Stöße mit dem Kollisionsgas (Collision-induced Dissociation, CID) Peptidfragmente gebildet, die nach kurzer Flugstrecke von den anderen Ionen selektiert werden können. Die LIFT-Zelle beschleunigt diese Ionen auf eine hohe Geschwindigkeit, damit diese den Reflektor gemeinsam durchwandern können. Beim 'konventionellen' Post-Source-Decay (PSD, Zerfall von Ionen in einem Massenspektrometer nach energetischer Anregung durch die Ionisierung) MS/MS können immer nur einzelne Fragmente den Reflektor durchwandern. Die erhaltenen Daten aus der Fragmentierung der Peptide über PSD bzw. LIFT sind jedoch erheblich komplexer als die aus Q-TOF MS/MS, da aufgrund der höheren Energie auch a- und c-Ionenserien entstehen und es häufig zu Wasser- und Ammoniakabspaltung von den Peptid-Fragmenten kommt.

HPLC-MS

Neben der Auftrennung von Proteingemischen durch 2D-Gelelektrophorese haben sich in den letzten Jahren auch Gel-lose Methoden zunehmend durchsetzen können. Hierbei werden die Proteinextrakte meist durch Reversed-Phase Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) aufgetrennt. Die HPLC ist direkt an den

Massenspektrometer gekoppelt und Peptide werden dort 'online' identifiziert. Als Massenspektrometer eignen sich hierzu nur solche mit optionalen Electrospray-Ionisierungsquellen, wie Q-TOF, Ionenfallen oder FT-ICR-MS.

Je nach zu untersuchendem Proteinextrakt müssen mehrere zehntausend Peptide aufgetrennt und analysiert werden. Um die Auftrennung zu verbessern, wird daher häufig eine weitere Dimension vorgeschaltet, zumeist die Kationenaustausch-Chromatographie wie z.B. in der Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) (Washburn *et al.*, 2001).

Ein Problem der gel-losen Methoden ist die Schwierigkeit der Quantifizierung von Proteinen. Hierzu gab es in den letzten Jahren Entwicklungen wie ICAT (Isotope-coded affinity tag) (Gygi *et al.*, 1999), bei der Peptide unterschiedlicher Proben mit unterschiedlichen Isotopen-markierten Reagenzien modifiziert werden. Anschließend werden die zu analysierenden Proteingemische vereint und mittels HPLC-MS analysiert. Da sich die korrespondierenden Peptide nur in den Isotopen ihrer Modifikationen unterscheiden, haben sie ähnliche Elutionseigenschaften und werden gleichzeitig am Massenspektrometer identifiziert. Aufgrund der Ionenintensitäten der unterschiedlichen Peptidmassen lassen sich so Aussagen über die relativen Mengen machen.

Ähnlich funktioniert die Markierung mit stabilen Isotopen in der Zellkultur (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC) (Ong *et al.*, 2002). Hierbei werden Zellkulturen mit unmarkierten (Zustand 1) bzw. ^2H -, ^{13}C - oder ^{15}N -markierten (Zustand 2) Aminosäuren angezogen. In der Massenspektrometrie lassen sich später die unterschiedlichen Mengen eines Proteins durch einen Vergleich der leichten und schweren Form berechnen. Nachteil dieser neuen Technologien sind die hohen Kosten für die Isotopen-markierten Substanzen und die großen Datenmengen der MS/MS-Spektren, die nur durch geeignete bioinformatische Programme auszuwerten sind.

Wissenschaftliche Erfolge der Proteomforschung

Durch Proteommethoden wurden in den letzten Jahren auf verschiedenen Gebieten der Biowissenschaften herausragende Entdeckungen gemacht. Ein Standbein der Proteomforschung ist die differentielle Proteomanalyse, die eine sehr große Menge an Daten, insbesondere bei der Untersuchung von Prokaryonten liefert.

Durch die Entschlüsselung des humanen Genoms (Venter *et al.*, 2001) wurde es möglich nach erfolgreicher Fraktionierung die Zusammensetzung von Multiproteinkomplexen wie z.B. dem Kernporenkomplex (Rout *et al.*, 2000) zu bestimmen und Organellenproteome wie z.B. das der Phagosomen (Garin *et al.*, 2001; Gagnon *et al.*, 2002) oder Mitochondrien (Mootha *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2003) aufzuklären. Aber auch Hunderte von Protein-Protein-Interaktionen wie z.B. in *S. cerevisiae* (Uetz *et al.*, 2000; Gavin *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2002) konnten identifiziert werden.

Zur Zeit werden vermehrt Proteome auf die über 100 verschiedenen post-translationalen Modifikationen untersucht. Insbesondere der Phosphorylierung von Proteinen wird dabei eine besondere Wichtigkeit beigemessen, da viele Signaltransduktionswege in Zellen über Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Proteinen funktionieren. Durch eine weitere Verbesserung der Technologien ist auch in naher Zukunft noch von weiteren wissenschaftlichen Durchbrüchen mittels Proteomtechniken zu rechnen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das human-pathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* exprimiert eine große Anzahl an sekretierten und Oberflächen-gebundenen Proteinen. Hierzu zählen auch alle primären Virulenzfaktoren, die durch ihre spezifischen Funktionen den fakultativ intrazellulären Infektionszyklus sicher stellen.

Ziel der Arbeit war es, die Subproteome der kovalent-gebundenen Oberflächenproteine und der sekretorischen Proteine von *L. monocytogenes* mit 2D-Gelelektrophorese und gel-losen Proteommethode umfassend zu charakterisieren. Durch Vergleich des wt Sekretoms mit dem einer *prfA*-Deletionsmutante sollten PrfA-regulierte Proteine identifiziert werden. Zusätzlich sollten durch einen Vergleich mit der apathogenen Art *Listeria innocua* Proteine identifiziert werden, die spezifisch für *L. monocytogenes* sind. Sowohl die PrfA-regulierten als auch die *L. monocytogenes*-spezifischen Proteine stellen neue putative Virulenzfaktoren dar.

Zur Untersuchung der bisher wenig untersuchten allgemeinen Wirtszellantwort auf listerielle Invasion sollte die Proteomanalyse von infizierten und nicht-infizierten Gewebekulturen etabliert und Unterschiede charakterisiert werden. Durch die Verwendung unterschiedlicher *L. monocytogenes*-Mutanten sollte die Beteiligung der jeweiligen listeriellen Oberflächenproteine bei der Infektion und ihr Einfluss auf das Wirtsproteom gezeigt werden.

Eines dieser Oberflächenproteine ist der Virulenzfaktor InlB. InlB ermöglicht durch Bindung an den Human-Growth-Factor-Rezeptor Met die Invasion von Listerien in nicht-phagozytierende Zellen. Durch Stimulation mit aufgereinigtem InlB und HGF sollten Unterschiede in der Wirtszellantwort mittels Methoden der Zellbiologie und der funktionellen Genomanalyse herausgearbeitet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Materialien

Alle Chemikalien und Materialien wurden soweit nicht anders erwähnt in p.A.-Reinheit von den Firmen Aldrich, Amersham Pharmacia, Applied Biosystems, Calbiochem, Fluka, GibcoBRL, Merck, Millipore, Riedel deHaën, Roche, Roth und Sigma bezogen.

Alle Lösungen wurden in deionisiertem Wasser, welches mit einem Milli-Q-System (Millipore) aufbereitet wurde, angesetzt.

2.1.1 Allgemeine Puffer

PBS (phosphate buffered saline, pH 7,2)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	1,77 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
ad 1 L mit bidest. Wasser	

TBS (Tris buffered saline, pH 7,5)

Tris base	6 g
NaCl	11,7 g
ad 1 L mit bidest. Wasser	

TBS-T

TBS

0,1% Tween 20 (v/v)

2.2 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

2.2.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: In der Arbeit benutzte Bakterienstämme

Organismus	Geno-/Phänotyp	Referenz/Herkunft
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue supercompetent cells	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (tet^r)</i>]	Stratagene, Amsterdam
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) CodonPlus™ RIL	F' <i>ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal^λ (DE3) endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam^r</i>]	Stratagene, Amsterdam
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD Serotyp 1/2a	<i>Listeria monocytogenes</i> wt	Leimeister-Wächter <i>et al.</i> , 1990
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD Δ <i>prfA</i>	<i>prfA</i> -Deletion	Domann <i>et al.</i> , 1992
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD pERL 7973	Konstitutiv <i>prfA</i> überexprimierender Stamm (<i>prfA</i> +))	Domann <i>et al.</i> , 1992
<i>Listeria innocua</i> CLIP11262 Serotyp 6a	<i>Listeria innocua</i> wt	Domann <i>et al.</i> , 1992
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD Δ <i>inlB2</i>	<i>inlB</i> -Deletion	Lingnau <i>et al.</i> , 1995
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD Δ <i>actA</i>	<i>actA</i> -Deletion	Domann <i>et al.</i> , 1992
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD Δ <i>srtA</i>	<i>srtA</i> -deletion	Bierne <i>et al.</i> , 2002b
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD Δ <i>srtA</i> p <i>PsrtA</i>	Komplementierte <i>srtA</i> - Deletionsmutante	Bierne <i>et al.</i> , 2002b

2.2.2 Plasmide

Tabelle 2.2: In der Arbeit benutzte Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Herkunft
pGEX-inlB321	<i>inlB</i> -Fragment aus <i>L. monocytogenes</i> in pGEX-6P-1	Schubert <i>et al.</i> , 2001
pGFP-FAK	Humane Focal Adhesion Kinase (FAK) C-terminal an GFP	C. Hauck, Würzburg
pEGFP-C1	Fusionsproteine mit C-terminalen GFP	Clontech

2.2.3 Kulturmedien und Antibiotika

Alle Medien für Bakterienkulturen wurden durch Autoklavieren (30 min, 121°C) sterilisiert. Hitzeempfindliche Medienkomponenten und Zusätze wurden sterilfiltriert (0,2 µm-Filter) und zum abgekühlten autoklavierten Medium zugegeben.

BHI-Medium:

37 g Brain-Heart-Infusion wurden in einem Liter Wasser gelöst und filtriert (10 kDa Ausschlußvolumen).

LB-Medium:

10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt und 120 mM NaCl wurden in einem Liter Wasser gelöst und autoklaviert.

SOC-Medium

Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,584 g
KCl	0,18 g
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

Minimal-Medium: (Premaratne et al., 1991)

KH ₂ PO ₄	6,56 g	DL-Isoleucin	0,1 g
NaHPO ₄ *7H ₂ O	30,96 g	DL-Valin	0,1 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,41 g	DL-Methionin	0,1 g
Eisencitrat	88 mg	L-Arginin*HCl	0,1 g
Glucose	10 g	Biotin	0,5 mg
L-Cystein*HCl	0,1 g	Riboflavin	5 mg
L-Glutamin	0,6 g	Thiamin*HCl	1 mg
L-Leucin	0,1 g	α-Lipoteichonsäure	5 µg

ad 1 L bidest. Wasser

Das Medium wurde immer frisch angesetzt, um ein Ausfallen zu vermeiden.

Agarplatten:

16 g Bacto-Agar wurden in einem Liter Medium gelöst.

Tabelle 2.3: Verwendete Antibiotikazusätze

Antibiotikum	Stammlösung	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Erythromycin	5 mg/ml in 70% EtOH	-	5 µg/ml
Ampicillin	100 mg/ml in bidest. H ₂ O	100 µg/ml	-
Gentamycin	5 mg/ml in bidest. H ₂ O	-	5 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in EtOH	34 µg/ml	-

Die Stammlösungen wurden bei –20°C bzw. 4°C gelagert und in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

2.2.4 Anzucht von *Escherichia coli* und Gewinnung von Plasmiden

Für die Kultivierung von *E. coli*-Zellen wurden 5-100 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und in einem Schüttelinkubator ü.N. bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Bei der Kultivierung von *E. coli* BL21 (DE3) *CodonPlus* wurde dem Kulturmedium zusätzlich 34 µg/ml Chloramphenicol zugefügt. Zur Anzucht von *E. coli*-Stämmen, die das Plasmid pGEX-6P-1 enthielten, erfolgte die Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin zum Medium. Mit der jeweiligen Vorkultur wurde die Hauptkultur (LB-Medium) auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und im Schüttelinkubator (37°C, 180 rpm) inkubiert.

Für die Gewinnung von Plasmiden wurden die Zellen abzentrifugiert und anschließend mittels des Qiagen Plasmid Midi-Präparations-Kits entsprechend der Vorschrift des Herstellers behandelt.

2.2.5 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung und Transformation kompetenter Zellen von *E. coli* BL21 (DE3) *CodonPlus* erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989). Eine *E. coli*-ü.N.-Kultur wurde in SOC-Medium (600 ml) bis zur OD₆₀₀=0,5 (frühe *log*-Phase) bei 37°C und 180 rpm kultiviert und anschließend für 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden in sterilen Bechern abzentrifugiert (JA-10-Rotor, 3000 xg, 10 min, 4°C), in 20 ml eiskalter 0,1 M

CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis gekühlt. Nach erneuter Zentrifugation (3000 xg, 10 min, 4°C) wurden die Zellen in 3 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und für 3 h auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden nach Zugabe von 10% (v/v) Glycerin in 300 µl-Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die zu transformierende DNA (100 ng) wurde vorsichtig mit 100 µl Zellsuspension auf Eis vermischt. Nach einem 5-minütigen Hitzeschock bei 37°C wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert (2 Wiederholungen). Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium erfolgte eine Inkubation für 60 min unter leichter Rotation bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen mit einem Drygalskispatel auf LB-Platten ausplattiert, die entsprechende Antibiotika zur Selektion transformierter Kolonien enthielten. Nach Inkubation der Transformationsplatten (ü.N., 37°C) wurden die erhaltenen Einzelkolonien zur weiteren Kultivierung mit sterilen Holzzahnstochern in 5 mL LB-Medium überführt bzw. auf frischen LB-Agarplatten zu Einzelkolonien ausgestrichen und bei 37°C kultiviert.

2.2.6 Anzucht von *Listeria*

Von einer BHI-Agarplatte wurde eine *L. monocytogenes* Kolonie mit einer Impföse bzw. einer sterilen Pipettenspitze abgenommen, in 5–25 ml BHI-Medium suspendiert und ü.N. bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert.

2.2.7 Aufreinigung von Zellwänden von *Listeria monocytogenes*

500 ml BHI wurden mit einer ü.N.-Kultur von *L. monocytogenes* 1:100 angeimpft und bei einer OD₆₀₀ = 0,8–1,0 geerntet (3000 xg, 10 min, 4°C). Die Bakterienpellets wurden 2x mit je 20 ml PBS und 1x mit 1M Tris-HCl, pH 7.5 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Tris-HCl pH 8 mit 0,5 mM Pefabloc (Roche) und 1 µl Benzonase (Merck) suspendiert und durch dreimaligen Durchgang durch die French Press (1000 psi, 4°C, Aminco) aufgeschlossen. Intakte Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3000 xg (10 min, 4°C) abgetrennt und die Zellwände durch Zentrifugation des ÜS bei 10000 xg (20 min, 4°C) erhalten.

Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8 mit 4% SDS und 4% Mercaptoethanol (EtSH) resuspendiert, in ein 1,5 ml Polypropylenreaktionsgefäß überführt und 15 min bei 16.000 xg zentrifugiert. Der ÜS wurde entfernt und im gleichen Puffer wieder suspendiert. Anschließend wurde die Suspension einmal im Ultraschallbad behandelt, einmal für 15 min auf 60°C erhitzt und das Waschen mit dem SDS-Puffer 3x wiederholt. Anschließend wurden SDS und EtSH durch fünfmaliges Waschen mit 0,1 M Tris-HCl, pH 8 entfernt und die Zellwandproteine durch Zugabe von 300 µl Trypsin (6 µg/ml, 37°C, ü.N., 850 rpm) verdaut. Die Suspension wurde 15 min bei 16.000 xg zentrifugiert und der ÜS vorsichtig abgenommen. Die Lösung wurde nach nochmaliger Zentrifugation in der Speedvac auf 30 µl eingeeengt und entweder durch ZipTip-Microcolumns oder Mikro-HPLC aufgereinigt. Die Identifizierung der Proteine wurde durch MS/MS-Fragmentierung am Q-TOF II (Micromass) durchgeführt.

2.2.8 Gewinnung listerieller Überstandsproteine

50 ml über-Nacht-Kulturen von *Listeria* in BHI wurden zentrifugiert und die Pellets in der gleichen Menge Minimalmedium resuspendiert. Nach 6 h Adaption an das Medium (37°C, 180 rpm), wurden 400 ml Kulturen mit einer $OD_{600}=0,05$ angeimpft und für 17 h bei 37°C unter ständigem Schütteln (180 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation am Ende der exponentiellen Phase bei einer $OD_{600}=1,1$ (*L. monocytogenes*) bzw. $OD_{600}=0,9$ (*L. innocua*) geerntet (3000 xg, 10 min, 4°C). Nach Filtration (0,22 µm) wurde dem ÜS Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF, 0,2 mM) hinzugefügt und die Lösung für 30 min mit 0,2 mg/mL Na-Deoxycholat bei 4°C inkubiert. Die Proteine wurden mit Trichloressigsäure (TCA) ü.N. bei 4°C inkubiert und somit gefällt.

2.3 Zellbiologische Arbeiten

2.3.1 Zelllinien

Tabelle 2.4: In der Arbeit benutzte Zelllinien

Zelllinie	aus	Herkunft/Referenz
HeLa	Humane Adenokarzinom-Epithelzellen (Gebärmutterhals)	ATCC: CCL-2
HeLa-S3	Humane Adenokarzinom-Epithelzellen (Gebärmutterhals)	Medizinische Hochschule Hannover; ATCC: CCL-2.2
Hep G2	Humane Hepatokarzinomzellen (Leber)	ATCC: HB-8065
Caco-2	Humane Adenokarzinom-Epithelzellen (Dickdarm)	ATCC: HTB-37
VA 13	Humane Fibroblasten, SV40 transformiert (Lunge)	ATCC: CCL-75.1

2.3.2 Medien und Zusätze

Standard-Medium

Zu Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 1000 mg/L Glucose und 110 mg/L Na-Pyruvat (Gibco BRL) wurden 10% FCS, 2 mM L-Glutamin (Flow Laboratories) und je 50 U/ml Penicillin/Streptomycin (P/S) zugefügt.

Hep G2-Medium

Zu Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4500 mg/L Glucose (Gibco BRL) wurden 10% FCS, 2 mM L-Glutamin (Flow Laboratories) und je 50 U/ml Penicillin/Streptomycin (P/S) zugefügt.

VA 13-Medium

Zu DMEM mit 1000 mg/L Glucose und 110 mg/L Na-Pyruvat (Gibco BRL) wurden 10% FCS (PAA-clone), 2 mM L-Glutamin (Flow Laboratories) und je 50 U/ml P/S zugefügt.

Infektionsmedium (IM) und Prä-Infektionsmedium (PIM):

DMEM mit 1000 mg/L Glucose und 110 mg/L Na-Pyruvat ohne P/S-Lösung und FCS (IM) bzw. ohne P/S-Lösung aber mit FCS (PIM).

Trypsin/EDTA-Lösung

0,5 g/L Trypsin-EDTA mit 0,2 g/L EDTA (Gibco BRL)

2.3.3 Stickstoffeinlagerung und Kulturbedingungen

Vor der Stickstoff-Einlagerung wurden die Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen (Nunc) bis zu 90% Konfluenz kultiviert. Die Zellen von zehn 10 cm-Schalen wurden durch Trypsin abgelöst, vereinigt und pelletiert (300 xg, 3 min). Das Pellet wurde in 5 ml Medium resuspendiert und anschließend wurde langsam auf Eis 5 ml 20% DMSO (v/v) in Medium zugetropft. Die Zellsuspension wurde zu jeweils 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Kryoröhrchen wurden über 24 h langsam auf -80°C gekühlt und dann in flüssigen Stickstoff eingelagert. Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen in einem 37°C -Wasserbad aufgetaut, in 5 ml kalten Medium aufgenommen, abzentrifugiert und in warmem Kulturmedium ausgesät. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank (Forma Scientific) bei 37°C in einer 7,5%igen (v/v) CO_2 -Atmosphäre.

Zur mikroskopischen Beobachtung wurden einen Tag vor der Fixierung die Zellen auf vorbehandelten Deckgläschen kultiviert. Zur Beseitigung von störenden Verunreinigungen wurden die Deckgläschen in einer Lösung aus 40% Ethanol und 60% konz. HCl gereinigt und anschließend mehrmals gründlich mit deion. H_2O gewaschen. Nach dem Trocknen erfolgte die Sterilisation unter UV-Licht für 30 min. Anschließend wurden sie für 45 min mit 25 $\mu\text{g/ml}$ Fibronectin-Lösung (Roche) beschichtet, wieder mehrmals mit PBS gewaschen und die Zellen auf die Deckgläschen pipettiert.

2.3.4 Trypsinisieren und Passage

Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80% erreicht hatten, wurden sie durch Abschaben (Caco-2, bzw. bei Proteinanalyse) oder enzymatisch (alle anderen Zelllinien), d.h. durch das Zerstören von Zell-Matrix-Verbindungen von dem Boden

der Kulturschale abgelöst, verdünnt und in einer neuen Kulturschale wieder ausgesät.

Um Serumreste zu entfernen wurden die Zellen zunächst mit vorgewärmten PBS gewaschen und anschließend solange in Trypsin-EDTA-Lösung (GibcoBRL) inkubiert, bis sich die Zellen sichtbar abgerundet hatten. Daraufhin wurden sie mit einer Pipette abgelöst, vereinzelt, das Medium durch Zentrifugation (3 min, 300 xg) entfernt und die Zellen mit frischem, vorgewärmten Medium verdünnt und in einer neuen Kulturschale replattiert.

2.3.5 Transfektion eukaryontischer Zellen

Bei der Transfektion wird Plasmid-DNA oder generell Fremd-DNA in eine eukaryontische Zelle eingebracht. Im Komplex mit den Transfektionsreagenzien wird die Plasmid-DNA durch die Zellmembran in das Cytoplasma geschleust. Ein Teil der transfizierten DNA kann in den Zellkern gelangen und dort transient exprimiert werden.

Die zu transfizierende DNA wurde durch Plasmidpräparation mit Anionenaustauschersäulen (Qiagen) aufgereinigt. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion so ausgesät, dass sie zum Transfektionszeitpunkt eine Konfluenz von 50-80% erreicht hatten. Dann wurden zu 96 µl serum-freien Medium 6 µl FuGENE 6-Transfektionsreagenz zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Diese Lösung wurde zu 2 µl DNA-Lösung (1 µg/µl) pipettiert, 15 min bei RT inkubiert und anschließend zu frischem Standardmedium in einer Kulturschale gegeben und durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig verteilt. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank für 20 h.

2.4 Allgemeine biochemische Methoden

2.4.1 Proteinfällungen

Proteinfällungen wurden durchgeführt, um Proteinextrakte aufzukonzentrieren und von Salz- und Detergenz-Rückständen zu befreien. Während dieser Arbeit wurden bakterielle Proteinextrakte mit TCA, die Proteine aus eukaryontischen Zellextrakten mit Phenol gefällt.

TCA-Fällung

Bei der TCA-Fällung macht man sich die geringe Löslichkeit der Proteine bei saurem pH zunutze. Zusätzlich wird das Gallensalz Deoxycholat, dass an Proteine bindet, als Fällungshilfe eingesetzt. Deoxycholat hat im neutralen Bereich eine sehr hohe Löslichkeit, im Säuren jedoch eine sehr geringe, weshalb es nach Zugabe der TCA ausfällt.

Die Proteinlösungen wurden auf 4°C gekühlt. Anschließend wurde Natriumdeoxycholat (20 µg/ml) zugesetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 6% TCA erfolgte eine Inkubation über Nacht. Nach einer Zentrifugation (4.000-16.000 xg, 4°C, 30 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in Aceton (-20°C) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Phenol/Aceton-Fällung

Bei der Phenol-Fällung werden Verunreinigungen durch mehrmaliges Waschen mit Wasser in einem 2-Phasen-System abgetrennt. Die Proteinfraction verbleibt in der Interphase, die DNA in der phenolischen und die RNA in der wässrigen Phase.

Die nach der Zellyse erhaltene Proteinlösung (~0,8 ml) wurde mit 0,7 ml eiskaltem, wassergesättigtem Phenol versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation (4°C, 16.000 xg), wurde die wässrige Phase abgenommen und verworfen. Anschließend wurden 0,7 ml H₂O zugegeben, gut durchmischt und der Vorgang 3x wiederholt.

Nach der vierten Abnahme des Überstandes wurden 0,7 ml Aceton (-20°C) zugefügt und das Pellet abzentrifugiert. Der Rückstand wurde noch einmal mit Aceton gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts der Extrakte wurden jeweils 3x 10 µl einer Probe mit 200 µl Bradfordreagenz (Biorad, 1:5 verdünnt) (Bradford, 1976) in einer Mikrotiterplatte vermischt, 10 min bei RT inkubiert und bei 595 nm im SpectraMax 250 (Molecular Devices) gemessen. Mit Hilfe einer Standardreihe mit BSA in definierten Konzentrationen von 0,1 mg/ml bis 1 mg/ml wurde der Proteingehalt der Extrakte aus der Absorption errechnet. Hierfür wurde die Software SoftMax™Pro (Molecular Devices) verwendet.

2.4.3 SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) wurde angewandt, um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen. Zur Durchführung wurde das Minigel-System von Biometra (85 x 65 x 0,5 mm) benutzt. Die Proben wurden vorher in 4x SDS-Probenpuffer (4% SDS; 4% Glycerin, 0,4% EtSH, 0,1% Bromphenolblau, 30 mM Tris-HCl, pH 6,8) 10 min bei 95°C erhitzt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Prestained Protein Ladder 10-180 kDa Marker von Fermentas benutzt. Von der *ready-to-use*-Lösung wurden jeweils 4 µl/Spur aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer (3 g/l Tris-Base, 14,4 g/l Glycin, 1% SDS). Die Proben liefen für 15 min bei 100 V in das Sammelgel ein, anschließend wurde die Spannung für ca. 1 h auf 160 V erhöht.

Trenngel (Angaben jeweils für 2 Mini-Gele):

	7,5%	10%	12%
Bidest. H ₂ O	7,4 ml	6,1 ml	5,1 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
Acrylamid/Bis (37,5:1)	3,8 ml	5 ml	6 ml
10% SDS	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl

Sammelgel (Angaben jeweils für 2 Mini-Gele):

Bidest. H ₂ O	6,1 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
Acrylamid/Bis (37,5:1)	1,5 ml
10% SDS	100 µl
TEMED	50 µl
10% APS	75 µl

2.4.4 Proteinfärbungen

Für die Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurden verschiedene Färbemethoden verwendet:

Silberfärbung

Um Gele mit einer geringen Gesamtproteinmenge anzufärben, wurde die Silberfärbung angewandt, die sehr sensitiv, aber nicht mit der massenspektrometrischen Analyse kompatibel ist.

Die Silberfärbung wurde wie folgt durchgeführt: die Gele wurden ü.N. fixiert (30% EtOH, 10% AcOH), 45 min sensibilisiert (3 g/l K₂S₄O₆, 41 g/l Na-Acetat, 30% EtOH) und 6x für je 10 min mit MilliQ H₂O gewaschen. Anschließend wurden die Gele für 1-2 h mit 0,2% Silbernitrat imprägniert, für 45 sec mit MilliQ H₂O gewaschen und für 1-30 min entwickelt (26 g/l Na₂CO₃, 0,03% Formaldehyd, 125 µl/l 10% Na₂S₂O₃). Wenn die Proteinspots gut zu erkennen waren, wurde die Entwicklung gestoppt (40 g/l Tris-Base, 20 ml/l AcOH). Gelagert wurden die Gele in Fixierlösung.

Kolloidal Coomassie-Färbung (Neuhoff-Färbung)

Proteine in Gelen wurden mit kolloidalem Coomassie oder RuBPS angefärbt, da diese über eine bessere Linearität und massenspektrometrische Kompatibilität verfügen.

Die kolloidale Coomassie-Färbung wurde nach Neuhoff (Neuhoff *et al.*, 1988) durchgeführt. 800 ml der Neuhoff-Lösung A (10% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2% (w/v) H_3PO_4) wurde mit 2 ml der Neuhoff-Lösung B (5% (w/v) Coomassie brilliant blue G-250 in bidest. H_2O) für mehrere Stunden kräftig geschüttelt. Vor Verwendung wurden 200 ml MeOH zugefügt. Die Färbung fand ü.N. bei Schütteln statt. Entfärbt wurde mit dest. H_2O .

RuBPS-Färbung

Der fluoreszierende Farbstoff Ruthenium II tris (bathophenanthrolin disulfonat) ist ein Derivat des kommerziell erhältlichen SyproRuby-Farbstoffes nach Rabilloud (Rabilloud *et al.*, 2001). Die Färbung ist ähnlich sensitiv wie die Silberfärbung, aber kompatibel mit der Massenspektrometrie. Die Gele wurden nach der Elektrophorese 3 h oder ü.N. fixiert (30% EtOH, 10% AcOH) und 4x je 15 Minuten mit 20% EtOH gewaschen, um SDS- und Säurereste zu entfernen.

Zur Färbung wurden 15 μl der nach Rabilloud *et al.* hergestellten Stammlösung in einen Liter 20%iges EtOH gegeben. Die Gele wurden über Nacht in der Färbelösung unter Lichtabschluß inkubiert und anschließend mit Fixier-Lösung entfärbt. Vor der Aufnahme wurden die Gele in 20% EtOH umgepuffert. Die Detektion wurde erfolgte am 2D-Gel-Scanner Molecular Imager FX mit dem Programm QualityOne 4.2.0 FX (BioRad). Die Gele wurden mit hoher Intensität und einer Auflösung von 100 μm eingescannt. Die Anregungsmaxima dieses Farbstoffes liegen bei 300 nm und 480 nm, Emissionsmaximum bei 618 nm.

ProQ-Färbung

ProQ-Diamond ist ein Fluoreszenzfarbstoff der spezifisch an phosphorylierte Aminosäureseitenketten bindet (Martin *et al.*, 2003). Dadurch lassen sich in 2D-Gelen Phosphoproteine nachweisen. Da die Bindung des Farbstoffs nur an den Phosphogruppen erfolgt, werden hochphosphorylierte Proteine stärker gefärbt. Der Farbstoff ist MS-kompatibel und nach erfolgter Aufnahme kann das Gesamtprotein

mit RuBPS angefärbt werden. Anregungsmaximum des Farbstoffes ist bei 555 nm, Emmisionsmaximum bei 580 nm.

Die Gele wurden nach Beenden des Laufs über Nacht in Fixierlösung gelegt. Anschließend wurden die Gele 4x je 15 min mit dest. H₂O gewaschen und anschließend für 3 h unter Lichtabschluß bei RT auf dem Schüttler mit ProQ-Lösung (Molecular Probes) gefärbt. Entfärbt wurden die Gele für mind. 18 h mit der Entfärbelösung (20% 1,2-Propandiol, 50 mM Na-Acetat, pH 4).

Die Detektion wurde erfolgte am 2D-Gel-Scanner Molecular Imager FX mit dem Programm QualityOne 4.2.0 FX (BioRad). Die Gele wurden mit mittlerer Intensität und einer Auflösung von 100 µm eingescannt.

2.4.5 Semi-dry Blot

Für den Proteintransfer von SDS-Polyacrylamid-Gelen auf Membranen wurde das Semidry-Elektroblot-Verfahren (Khyse-Anderson, 1984) verwendet.

Die Übertragung der Proteine aus den SDS-Gelen erfolgte auf Polyvinylidendifluorid-(PVDF) Membranen. Dazu wurde das Trenngel nach der SDS-PAGE für 5 min in Transferpuffer (14,3 g/l Glycin, 3 g/l Tris-Base, 0,1% SDS, 20% MeOH) äquiliert. Eine Transfermembran von der Größe des Gels wurde für 1 min in Methanol aktiviert und dann für 2 min in Transferpuffer inkubiert. In dieser Zeit wurde Whatman-Papier, ebenfalls auf die Größe des Gels zugeschnitten, kurz in Transferpuffer getränkt und luftblasenfrei auf die Kathodenplatte der Transferkammer platziert. Darüber wurde das Gel und anschließend die Membran ebenfalls luftblasenfrei geschichtet. Zwischen das Gel und die Anodenplatte der Transferkammer wurde erneut in Puffer äquilibriertes Whatman-Papier gelegt. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei einer Stromstärke von 0,8-1 mA/cm² Membranfläche. Nach Transferende wurde die Membran für den anschließenden immunologischen Nachweis von Proteinen weiterbehandelt.

2.4.6 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Während dieser Arbeit wurden ein InlB₃₂₁-GST-Konstrukt überexprimiert und aufgereinigt. Die Versuche wurden entsprechend der Dissertation von M. Machner (Machner, 2002) durchgeführt.

2.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) (O'Farrell, 1975; Klose, 1975) wurde zur Auftrennung von Proteinextrakten angewandt. Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) der Proteine in der ersten Dimension wurden immobilisierte pH-Gradienten (Bjellqvist *et al.*, 1982) benutzt, in der zweiten Dimension, deren Laufrichtung um 90° versetzt war, eine SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

2.5.1 Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Bei der isoelektrischen Fokussierung werden Proteine aufgrund ihrer Nettoladung aufgetrennt. In einem Gelstreifen mit pH-Gradienten, an den ein elektrisches Feld angelegt ist, wandern Proteine, bis ihre Nettoladung null ist, d.h. sie ihren sogenannten isoelektrischen Punkt (pI) erreicht haben. Die Proteine werden also aufgrund ihrer Ladung aufgetrennt.

Für die IEF wurden die Systeme der IPGphor und Multiphor II (Amersham) sowie Gelstreifen mit immobilisierten pH-Gradienten (Amersham) verwendet.

Quell-Lösung:

5,4 g Harnstoff und 1,5 g Thioharnstoff wurden in einer Lösung aus 8,5 ml MilliQ H₂O, 1 ml Isopropanol und 0,5 ml Glyzerin gelöst und eine Spatelspitze des Ionenaustauschers Serdolit MB-1 zugefügt. Nach dem vollständigen Lösen des Harnstoffs wurde der Ionenaustauscher über einen Faltenfilter entfernt und 400 mg CHAPS, 2 mg Tris-Base, 46 mg DTT, sowie 1 Tablette Complete Mini (Proteaseinhibitoren von Roche) zugefügt (basierend auf: Hoving *et al.*, 2002).

Für die IEF wurden 18 cm-IPG-Streifen (Amersham) benutzt. Im Allgemeinen wurden 300-1000 µg Protein nach Phenol- oder TCA-Fällung in 350 µl Quellsolution gelöst und 4,8 µl Ampholyte (Amersham) und 1 µl Bromphenolblau-Lösung zugefügt. Nach dem Lösen der Probe wurde diese vor dem Auftragen auf die IEF-Streifen bei 100.000 xg für 30 min (20°C) zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen.

Wenn für die IEF die Multiphor benutzt wurde, wurden die Streifen für 24 h bei RT mit der Proteinlösung rehydriert.

Für die Multiphor und IPGphor wurden folgende Spannungsgradienten benutzt:

Tabelle 2.5: Spannungsgradient IPGphor (20°C, ~200 kVh)

Rehydration	30 V	14 h	Step-n-hold
Step 1	100 V	3 h	Gradient
Step 2	300 V	3 h	Gradient
Step 3	3000 V	3 h	Gradient
Step 4	5500 V	1 h	Gradient
Step 5	5500 V	20 h	Step-n-hold
Step 6	8000 V	2 h	Gradient
Step 7	8000 V	∞	Step-n-hold

Tabelle 2.6: Spannungsgradient Multiphor (20°C, ~150 kVh)

Step 1	150 V	150 Vh
Step 2	150 V	300 Vh
Step 3	600 V	3600 Vh
Step 4	1500 V	6 kVh
Step 5	3500 V	15 kVh
Step 6	3500 V	∞

2.5.2 Äquilibration

Die fokussierten Streifen wurden nach der IEF mit der Gelseite nach oben in ein Kunststoffgefäß gelegt und für 10 min in Äquilibration-Lösung (6 M Harnstoff, 30% Glycerin, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.8) mit 1% DTT inkubiert. Die Zugabe von DTT erfolgte, um die Disulfidbrücken der Proteine zu reduzieren. Anschließend wurden die Gelstreifen für 10 min in Äquilibration-Lösung mit 4,8% Iodacetamid inkubiert, wobei die Cysteine carboxymethyliert werden. Durch die Carboxymethylierung wird eine Oligomerisierung durch Disulfidbrückenrückbildung der Proteine verhindert und eine bessere Auftrennung nach dem Molekulargewicht in der SDS-PAGE ermöglicht (Gorg et al., 2000).

2.5.3 SDS-PAGE (2. Dimension)

Die Proteine werden bei der Elektrophorese mit SDS beladen und erhalten dadurch eine negative Gesamtladung. Im elektrischen Feld wandern die Proteine durch das Polyacrylamid-Gel je nach Molekülgröße und werden somit ähnlich ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Zur Durchführung der 2. Dimension wurden Geräte des Iso-Dalt Systems (Amersham) und SDS-Polyacrylamidgele mit einer Abmessung von 20 x 18 cm verwendet. In dem Dalt Multiple Gel Caster (Hoefer/Amersham) wurden 10-15%ige SDS-Gradientengele von 1,5 mm Dicke gegossen. Der verwendete Gradientenmischer (Hoefer/Amersham) wurde mit folgenden Lösungen gefüllt:

Polyacrylamidgele

	leichte Lösung (10%)	schwere Lösung (15%)
Acrylamid (37,5:1)	357,14 ml	535,71 ml
1,5 M Tris-HCl pH8,8	275,00 ml	275,00 ml
deion. Wasser	443,98 ml	184,37 ml
Glycerin	0 ml	88,00 ml
10% APS	11 ml	5,5 ml
10% TEMED	1570 µl	420 µl

Die Gele wurden erst mit wassergesättigtem n-Butanol und nach begonnener Polymerisierung mit SDS-Laufpuffer überschichtet und konnten ü.N. bei RT auspolymerisieren. Gelagert wurden die Gele in 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS bei 4°C.

Zum Starten der 2. Dimension wurden die IPG-Streifen auf das SDS-Gel gelegt und mit 1%iger Agarose (low EEO, Biomol; in Laufpuffer und mit einer Spatelspitze Bromphenolblau), eingegossen. Nach 30minütigem Einlaufen der Proteine bei 70 V, wurden diese bei 10°C für ca. 20 h bei 120 V aufgetrennt bis die Laufront das Gelende erreichte.

2.6 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse wurde sowohl zur Identifizierung der Proteine aus 2D-Gelen als auch zur Identifizierung von Proteinen aus Gemischen bzw. nach Auftrennung über eine HPLC eingesetzt.

2.6.1 MS-Probenvorbereitung nach 2D PAGE

Für die Probenvorbereitung der Proteine aus 2D-Gelen wurde eine leicht abgewandelte Vorschrift von Shevchenko *et al.* verwendet (Shevchenko *et al.*, 2000). Die ausgestochenen Proteinspots wurden bei Raumtemperatur mit Wasser gewaschen, anschließend mit Acetonitril (ACN) dehydriert und mit 50 mM NH_4HCO_3 rehydriert. Nach erneuter Dehydrierung durch ACN wurden die Gelstücke mit Trypsinlösung 2 $\mu\text{g/ml}$ (sequencing grade, Promega) rehydriert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

Die Peptide wurden aus den Gelstücken mit 15 μl 50 mM NH_4HCO_3 gefolgt von 30 μl ACN und 30 μl 5%iger Ameisensäure (FA) gefolgt von 30 μl ACN extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und in einem Vakuumkonzentrator auf 15 μl reduziert bzw. zur Trockene eingedampft.

2.6.2 Guanidierung

Bei der Guanidierung erfolgt eine Modifikation der Lysine in Peptiden zu Homoargininen. Hierdurch erhöht sich die Gasphasenbasizität der Aminosäurereste und die Ionisierungseffizienz durch MALDI wird erheblich verbessert (Brancia *et al.*, 2000). Des weiteren ist die Guanidierung Teil des Mass-Coded Abundance Tags (MCAT) (Cagney *et al.*, 2002).

Die eingetrockneten Peptide wurden in 20 μl 50 mM NH_4HCO_3 aufgenommen, 20 μl frisch angesetztes OMI (0,5 M o-Methylisoharnstoff mit Ammoniaklösung auf pH 10 eingestellt) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die guanidierten Peptide wurden wiederum im Vakuumkonzentrator eingetrocknet.

2.6.3 Aufreinigen und Entsalzen der Peptide

Um Peptidproben aufzureinigen und zu entsalzen, wurden Pipettenspitzen verwendet, die C₁₈-Reversed-Phase-Material enthalten (Ziptips, Millipore). Die Benutzung erfolgte ähnlich der Vorschrift des Herstellers. Die Spitzen wurden 5x mit 10 µl 65% MeOH/0,1% Ameisensäure (FA) gewaschen, 5x mit 10 µl 0,2% MeOH/0,1% FA äquilibriert und anschließend die Peptide durch mehrmaliges Aufsaugen an das Säulenmaterial gebunden. Die Probe wurde durch 10maliges Waschen mit 0,2% MeOH/0,1% FA gereinigt und mit 1-4 µl 65% MeOH/0,1% FA eluiert.

2.6.4 Proteinidentifikation durch MALDI-TOF MS

Bei der MALDI-TOF MS werden die Peptide mit einer organischen Matrix kristallisiert und durch 3 Nanosekunden kurze Pulse eines N₂-Lasers verdampft, in der Gasphase ionisiert und anschließend durch einen Flugzeitmassenspektrometer identifiziert (siehe Einleitung). Das während der Arbeit verwendete Gerät war ein Ultraflex TOF/TOF (Bruker-Daltonics, Bremen). Die Proben wurden entweder auf Stahl- oder Ankertargets aufgetragen. Ankertargets besitzen eine kleine hydrophile Region, auf der sich der Tropfen zusammenzieht und die Peptide sich anreichern, wodurch die Sensitivität erhöht wird.

1 µl der Probe wurde auf das Target pipettiert und anschließend mit 1 µl einer gesättigten Lösung von α-Cyano-Hydroxyzimtsäure in 40% ACN/0,1% TFA gemischt. Nach dem Trocknen wurden die Kristalle visuell überprüft und gegebenenfalls mit 40% ACN/0,1% TFA umkristallisiert. Anschließend wurde das Target in den Massenspektrometer eingeschleust.

Die TOF-Spannung des Massenspektrometers betrug 25 kV, die des Reflektrons 26,3 kV. Der N₂-Laser hat eine Wellenlänge von 337 nm und eine Pulslänge von 3 ns bei einer Schussfolge von 50 Hz. Es wurden von jeder Probe 200 Schuss aufsummiert, wobei nach 20 Schuss der Laserpunkt verschoben wurde. Als Standard wurde der Pepmixstandard von Bruker verwendet, der aus Angiotensin 1, Angiotensin 2, Substance P, Bombesin, ACTH(1-17), ACTH(8-39) und Somatostatin besteht.

Wurden Fragmentationsdaten gebraucht, wurden Peptidmassen ausgewählt und mittels der LIFT-Technik diese Peptide einer Dissoziation unterworfen. Die Ionisierungsspannung betrug in diesen Fällen 8 kV, die LIFT-Spannung 20 kV und die Reflektorspannung 29,2 kV. Es wurden von jeder Probe 1000 Schuss aufsummiert, wobei nach 50 Schuss der Laserpunkt verschoben wurde.

2.6.5 Proteinidentifikation durch ESI-Q-TOF MS

Proben für die Analyse mittels Electrospray-Ionisierung Quadrupol-Time-of-Flight (ESI Q-TOF) Massenspektrometrie wurden in 65% MeOH/0,5% FA gelöst. Wenige Mikroliter der Lösung wurden in Gold/Palladium-beschichtete Glasnadeln der Firma Proxeon Biosystems eingebracht und diese an einem Q-TOF 2 Massenspektrometer (Micromass, Manchester, UK) analysiert. Die Kapillarspannung betrug 0,9 bis 1,3 kV, die TOF-Spannung 9,1 kV, die Reflectron-Spannung 35,35 kV und die Multichannelplate (MCP)-Spannung 2,3 kV. Als Kollisionsgas diente Argon.

2.6.6 Proteinidentifikation durch HPLC-MS

Bei der HPLC-MS werden Proteingemische über eine Reversed-Phase Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt und direkt in den Massenspektrometer geleitet. Die HPLC bestand aus der Ultimate (Dionex) mit einem Famos Micro-Autosampler (Dionex). Vor der Hauptsäule (PepMap C18; Partikelgröße 100 Å; Ø 75 µm; Länge 15 cm) war eine Vorsäule zur Vorreinigung angeschlossen (C18; Partikelgröße 300Å; Ø 300 µm; Länge 5 mm). Die Flussrate über die Vorsäule betrug 30 µl/min, über die Trennsäule 200 nl/min. Laufmittel für die Vorsäule war 0,1% TFA in Wasser, Laufmittel für die Trennsäule war 5% ACN/0,1% FA in MilliQ Wasser (A) und 80% ACN/0,1% FA in MilliQ Wasser (B). Der Gradient war linear von 0 auf 60% B in 120 min.

Bei der HPLC-gekoppelten MS wurden am Q-TOF2 (Micromass) folgende Einstellungen benutzt: Übersichtsspektren von 400-1300 m/z und MS/MS von 50-2000 m/z; Kapillarspannung 1,5 kV; Cone-Spannung 35 V; Quelltemperatur 80°C; Desolvationstemperatur 250°C. Die übrigen Einstellung waren entsprechend der ESI-Q-TOF-MS-Messungen (Kapitel 2.6.5).

2.6.7 Auswertung der Massenspektren

Je nach Art des Massenspektrometers wurden die Massenspektren mit unterschiedlichen bioinformatischen Methoden ausgewertet. Alle Suchanfragen wurden gegen die in der Listeriendatenbank ListiList enthaltenen Genome bzw. das Humangenom von NCBI an den GBF-internen Mascot-Server (Matrixscience) (Perkins *et al.*, 1999) geschickt. Bei der Analyse mit Mascot wurde ein möglichst hohe Massengenauigkeit, üblicherweise 50 oder 100 ppm, als feste Modifikation Carbamidomethylierung (bei Proben aus 2D-Gelen) und als variable Modifikationen Oxidation von Methionin sowie die Phosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten eingestellt. Für eine erfolgreiche Identifikation war ein 'Mowse-Score' des Mascotprogramms von 70 erforderlich. Bei niedrigeren Scores wurden die Analysen manuell überprüft.

MALDI Peptidfingerabdruck-Spektren und LIFT-Fragmentationsdaten wurden durch die Software Biotoools und Flex-Analysis (Bruker Daltonics) ausgewertet. Bei Zuordnung und Bewertung der Spektren verwendet die Software den Algorithmus von Mascot (Matrixscience).

MS-Spektren, die vom Q-TOF Massenspektrometer erhalten wurden, wurden mittels der beigefügten Software MassLynx ausgewertet. MS/MS-Spektren wurde automatisiert mittels Sonar (Proteometrics) oder manuell mittels Peptidesequencing von Biolynx/Masslynx und anschließender BLAST-Suche gegen das entsprechende Genom ausgewertet.

Die Massenspektrometrie-Daten von LC-MS/MS umfassen sehr viele Spektren. Daher wurden die Spektren in Textdateien (sogenannte .pkl-Dateien) umgewandelt und anschließend zur automatisierten Suche gegen den Mascot-Server geschickt werden. Um eine Massengenauigkeit von besser als 50 ppm für die Peptid-('Mutter')-Ionen zu erhalten, wurden die positiven Identifikationen des ersten Suchlaufes zur nachträglichen Kalibrierung durch einen iterativen Kalibrierungsalgorithmus benutzt. Zur weiteren Analyse wurden nur Peptide mit einem Rang von 1 als signifikant angesehen. Identifikationen mit geringem Mowse-Score wurden entweder verworfen oder manuell verifiziert.

Daten der LC-MS/MS-Läufe der sekretorischen Proteine wurden in die LEGER-Proteom-Datenbank (<http://leger.gbf.de>) (G. Dieterich *et al.*, in Vorbereitung), die statische Daten der Genome von *L. monocytogenes* und *L. innocua* enthält, eingegeben und ausgewertet.

2.6.8 Diskontinuierliche Expressionsanalyse (DEA)

Durch die in unserem Labor entwickelte Diskontinuierliche Expressionsanalyse (DEA) können die relativen Mengen einzelner Proteine in niedrig komplexen Gemischen zueinander bestimmt werden. Hierzu werden Proteingemische (wie. z.B. das Sekretom von *Listeria*) in 4 unterschiedlichen Mengen (50, 100, 200, 400 ng) mehrmals mittels LC-MS/MS aufgetrennt und identifiziert. Für die relative Quantifizierung werden die niedrigsten Konzentrationen, bei denen das Protein in den unterschiedlichen Stämmen identifiziert wird, gegenübergestellt. Ist beispielsweise ein Protein im Stamm A bei allen Experimenten bis 50 ng identifiziert worden, aber im Stamm B nur bei den Experimenten mit 400 ng, ist die relative Expression zwischen den beiden Stämmen für dieses Protein >8.

DEA wurde zur Expressionsbestimmung von Überstandsproteinen von *L. monocytogenes* wt und $\Delta prfA$ benutzt. Es wurden Proteine aus 4 unabhängigen Ansätzen, wie unter Kapitel 2.2.8 beschrieben, erhalten. Die Proteinpellets wurden in 50 mM NH_4HCO_3 gelöst und mittels Bradford-Reagenz (Bradford, 1976) auf 1 mg/ml eingestellt. Die Proteine wurden ü.N. durch Trypsin (sequencing grade, Promega, im Verhältnis 50:1) bei 37°C verdaut und mit 0,1% TFA auf die endgültige Konzentration verdünnt.

10 µl jeder Probe (50-400 ng) wurden auf der nano-HPLC aufgetrennt und mittels eines Q-TOF 2 Massenspektrometers analysiert (siehe Kapitel 2.6.6).

2.7 Immunologische Arbeiten

2.7.1 Antikörper

Serumüberstände wurden unverdünnt angewendet, aufgereinigte Antikörper wurden in 1% BSA in PBS angesetzt.

Tabelle 2.7: Monoklonale primäre Antikörper (Serumüberstände)

Bezeichnung	Isotyp	Antigen	Referenz
IC100F4	Maus IgG	Internalin B	J. Wehland, GBF
IC199B10	Maus IgG	Internalin B	J. Wehland, GBF
IC52G9	Maus IgG	Internalin B	J. Wehland, GBF
IF32F8	Maus IgG	Internalin B	J. Wehland, GBF
IF72G11	Maus IgG	Internalin B	J. Wehland, GBF

Tabelle 2.8: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Spezifizierung
A4a	1:1000	Ziege- <i>anti</i> -Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat (Dianova)
A12c	1:1000	Ziege- <i>anti</i> -Maus-IgG-Alexa488-Konjugat (Mabtec)
A13c	1:1000	Ziege- <i>anti</i> -Maus-IgG-Alexa594-Konjugat (Mabtec)
B4c	1:1000	Ziege- <i>anti</i> -Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (Dianova)
B12c	1:1000	Ziege- <i>anti</i> -Kaninchen-IgG-Alexa488-Konjugat (Mabtec)
B13c	1:1000	Ziege- <i>anti</i> -Kaninchen-IgG-Alexa594-Konjugat (Mabtec)
G7c	1:100	Esel- <i>anti</i> -Ziege-IgG-Cy3-Konjugat (Dianova)

Tabelle 2.9: Polyklonale Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	aus	Herkunft/Referenz
α - <i>Listeria</i> -Antikörper K52	Intrazelluläre <i>Listeria</i>	Kaninchen	J. Wehland, GBF
α -ActA-Antikörper	ActA	Kaninchen	K. Niebuhr-Ebel, GBF
α -Stathmin	Humanes Stathmin	Kaninchen	Sigma
α -HGF (biotinyliert)	Humanes HGF	Ziege	R&D Systems
α -PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase	Kaninchen	Upstate

Tabelle 2.10: Sonstige Lösungen für die Immunfluoreszenz

Kürzel	Verdünnung	Bezeichnung	Spezifität	Herkunft/Referenz
Ph12	1:200	Phalloidin-Alexa488-Konjugat	Aktin	Mobitec
Ph13	1:200	Phalloidin-Alexa594-Konjugat	Aktin	Mobitec
Sk13	1:1000	Streptavidin-Alexa488-Konjugat	Biotin	Mobitec
Hoechst33258	1:1000	Bisbenzimid	DNA	Sigma

2.7.2 Immundetektion und Chemolumineszenz

Die Detektion auf PVDF-Membran-geblotteter Proteine erfolgte durch Antikörper. Im ersten Schritt binden spezifische Antikörper an das zu untersuchende Protein und anschließend Peroxidase-gekoppelte Sekundär-Antikörper an die Primärantikörper. Durch die Peroxidaseaktivität wird nach Zugabe von entsprechenden Lösungen in Anwesenheit von H_2O_2 Luminol oxidiert. Bei diesem Prozess wird Licht freigesetzt, das über einen Röntgenfilm oder eine CCD-Kamera sichtbar gemacht werden kann.

Die Membran wurde nach dem Transfer für 1 h mit Blockierlösung (5% (w/v) Magermilchpulver in TBS) bei RT abgesättigt, und anschließend bei 4°C ü.N. mit dem primären Antikörper in Blockierlösung inkubiert. Zur Entfernung der ungebundenen primären Antikörper wurde die Membran nachfolgend für je 10 min mit TBS-T, TBS-T mit 0,5 M NaCl, TBS-T mit 0,5% Triton-X 100 (v/v) und TBS-T gewaschen. Anschließend wurde für 1 h bei RT mit dem sekundären, in Blockierlösung verdünnten Antikörper inkubiert. Nach Entfernung ungebundener sekundärer Antikörper durch Waschen mit TBS-T erfolgte die Nachweisreaktion. Hierzu wurde das Peroxidase-Substrat (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche) den Angaben des Herstellers entsprechend angesetzt. Die gewaschene Membran wurde für ca. 1 min bei RT mit der proteintragenden Seite nach oben mit Substrat benetzt und die Chemolumineszenz mittels einer CCD-Kamera (Fuji LAS-1000 von Raytest) in einer Dunkelkammer (Intelligent Dark Box, Fuji) aufgenommen.

2.7.3 Immunfluoreszenzmikroskopie fixierter Zellen

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden spezielle Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorophore) an Proteine oder andere Zellbestandteile gekoppelt. Durch Anregung mit einer definierten Wellenlänge emittieren diese Farbstoffe Licht mit einer längeren Wellenlänge, sie fluoreszieren. Durch Fluoreszenzmarkierung von Proteinen ist es möglich, die räumliche und zeitliche Lokalisation der markierten Zellbestandteile in lebenden oder fixierten Zellen zu bestimmen.

Bei der indirekten Immunfluoreszenz fixierter Zellen erfolgte die Visualisierung der Proteine entweder durch Protein-Fluorophor-Konjugate oder durch die Bindung eines primären Antikörpers, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht wird. Durch die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einem primären Antikörper wird eine hohe Sensitivität erreicht, deren Prinzip auch in quantitativen Methoden genutzt wird (z.B. ELISA).

Für Immunfluoreszenzaufnahmen wurden einen Tag vor der Fixierung die Zellen auf vorbehandelten 12 mm Deckgläschen in 24-Loch-Schalen (Nunc) mit je 1 ml Kulturmedium kultiviert.

Zur Fixierung der Zellen wurden diese einmal mit PBS gewaschen und 20 min mit je 1 ml 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur inkubiert, welches die Proteine vernetzt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für 1 min bei Raumtemperatur mit 0,1%igem Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen erneut 2x mit TBS gewaschen. Für die folgende Antikörperhybridisierungen wurden die jeweiligen Lösungen auf ein Stück Parafilm getropft und die Deckgläschen mit der zelltragenden Seite daraufgelegt. Die Zellen wurden zum Abblocken der unspezifischen Bindungsstellen auf 15 µl 1% BSA-Lösung für 15 min inkubiert. Nach Waschen der Deckgläschen mit TBS erfolgte eine Inkubation für 30 min mit 15 µl einer Lösung des Erstantikörpers. Durch zweimaliges Waschen mit TBS wurden überschüssige Antikörper entfernt und anschließend mit 15 µl des Sekundärantikörpers und Phalloidin für 30 min inkubiert. Wieder wurde 2x mit TBS gewaschen und die Zellkerne durch 10minütiges Inkubieren mit 15 µl einer Hoechst33258-Lösung (Sigma) angefärbt. Die Deckgläschen wurden 3x in TBS gewaschen, auf 2 µl Mowiol/10% N-propyl-Gallat auf einen Objektträger gelegt, überschüssige Flüssigkeit entfernt und 1 Stunde bei 37°C getrocknet. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln bei 4°C.

2.7.4 Geräte für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Es wurde ein Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 135 TV (Carl Zeiss) mit regelbarer 100 W Quecksilberhochdruckdampflampe (AttoArc System, Carl Zeiss) und manuell oder durch Software kontrollierbarem Filterrad verwendet; durch Optovar-Linsen ließ sich die Gesamtvergrößerung um das 1,6fache bzw. 2,5fache erhöhen.

Als Objektive wurden Plan-Apochromat- und Plan-Neofluar-Immersionsölobjektive (Carl Zeiss) mit 100x (1,3 NA) bzw. 40x (1,4 NA) Vergrößerung sowie ein Immersionsöl (Carl Zeiss) mit einem Brechungsfaktor von 1,518 verwendet.

Die Regelung der Beleuchtung durch elektrisch aktivierbare Schnellverschlüsse ("Shutter") (UniBlitz Modul D 122 Shutter-Driver, Visitron Systems) waren manuell oder Software-unterstützt.

Zur Aufnahme wurde eine auf -25°C gekühlte Charged-Coupled-Device-Kamera (TE/CCD-1000 TKB, Princeton Instruments Inc.) mit elektronisch aktivierter Kontrolleinheit und Verschluss benutzt.

Die Aufnahmekontrolle, die Kontrolle der Schnellverschlüsse, die Kamerasteuerung und die Bildverarbeitung erfolgte mit der IPLab Spectrum Scientific Imaging Software an einem Apple Macintosh 9500/200. Die weitere Bildverarbeitung für die Präsentation erfolgte mit Adobe Photoshop 6.0.

2.8 Analyse der Wirtszellantwort auf listerielle Invasion

2.8.1 Infektion von eukaryontischen Zellen mit *Listeria monocytogenes*

25 ml BHI-Medium wurden mit 1,5 ml einer ü.N.-Kultur Listerien angeimpft. Nach 2,5 h Wachstum wurde 1 ml der Kultur von $OD_{600} = 1,0$ abgenommen und die Zellen abzentrifugiert. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und in 1 ml Infektionsmedium (IM) resuspendiert.

Humanen Zelllinien (HeLa, Caco2) wurden 2 Tage vor der Infektion in 10 cm Petrischalen umgesetzt und 24 h vor der Infektion mit P/S-freien Medium (PIM) versetzt. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit 10 ml IM überschichtet. Es wurden 10 µl der Bakteriensuspension zugegeben, die Bakterien verteilt, bei 250 xg (3 min, RT) auf die Zellen zentrifugiert und für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Nach 1,5 h wurde das Medium abgenommen, 2x mit PBS gewaschen und neues PIM auf die Zellen gegeben. Dieser Vorgang wurde nach weiteren 1,5 h wiederholt.

Zur Zellernte wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 5 ml PBS abgeschabt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (300 xg, 3 min, RT), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet anschließend mit Phosphatase-hemmenden Lysispuffer (1% Igepal CA 630, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 Tablette Mini-Complete Protease-Inhibitor Mix auf 10 ml) aufgeschlossen.

2.8.2 Analyse der Wirtszellantwort nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Proteinextrakte der nach 2.8.1 behandelten Zellen wurden Phenol-gefällt (siehe 2.4.1.2) und anschließend auf der Multiphor in der 1. Dimension aufgetrennt. Die Auftrennung in der 2. Dimension erfolgte auf 10-15%igen Polyacrylamid-Gelen.

Die Gele wurden RuBPS-gefärbt (siehe 2.4.4.3), mit einer CCD-Kamera oder einem Fluoreszenz-Scanner aufgenommen und mittels Proteomweaver 2.0 (Definiens) ausgewertet. Wenn eine Phosphoproteomanalyse durchgeführt wurde, wurden die Gele vor der RuBPS-Färbung mit dem Phosphoprotein-Farbstoff ProQ angefärbt (siehe 2.4.4).

2.8.3 Analyse der Wirtszellantwort durch Puls-Chase Experimente

25 ml BHI-Medium wurden mit 1,5 ml einer ü.N.-Kultur Listerien angeimpft. Nach 2,5 h Wachstum wurde 1 ml der Kultur mit einer $OD_{600}=1,0$ abgenommen und die Zellen abzentrifugiert. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und in 1 ml Cystein- und Methioninfreiem DMEM resuspendiert.

Zellkulturen von HeLa in 6-Loch-Platten wurden mit PBS gewaschen und mit 1 ml DMEM-Medium ohne Methionin und Cystein überschichtet. Anschließend wurden 10 μ l der Bakteriensuspension und entweder sofort oder nach 1,5 h 10 μ l ($\sim 150 \mu$ Ci) der radioaktiven L- $[^{35}\text{S}]$ -Methionin/Cystein-Mischung (Pro-Mix $[^{35}\text{S}]$ -*in vitro* cell labeling mix, Amersham) zugegeben.

Nach 6 h Infektion wurden die Zellen gewaschen, abgeschabt und mit 30 μ l Quellungslösung aufgeschlossen. Zum Verdau der DNA wurden 1,5 μ l Benzonase (Roche) zugesetzt.

Nach erfolgter 2D-GE wurden die Gele zwischen Zellophan getrocknet und 3 Tage auf Phosphorimagerplatten (B-Screens, FujiFilm) gelegt. Anschließend wurden die Phosphoscreens mittels des Phosphorimager BAS-2500 (FujiFilm) aufgenommen.

Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgte durch manuelle Analyse mit den Programmen Proteomweaver 2.0 (Definiens) und AIDA (Raytest).

2.8.4 Analyse der Wirtszellantwort nach Induktion mit Internalin B oder HGF

HeLa-Zellen in 10 cm-Schalen wurden bis 70%iger Konfluenz angezogen und anschließend wurde ihnen für 24 h das Serum entzogen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 5-30 min mit serum-freien Medium überschichtet. Für die Induktion mit HGF oder Internalin B wurden 1,5 nM HGF (Human, rekombinant, Sigma) bzw. 1,5 nM Internalin B₃₂₁ zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abgeschabt und für 3 min bei 200 xg abzentrifugiert. Die Zellen wurden in Lysispuffer (siehe Kapitel 2.8.1) aufgeschlossen und die Proteine mittels Phenol gefällt. Nach 2D-GE wurden die Proteine mittels semi-dry Blot auf PVDF-Membranen transferiert und mit Antikörpern spezifische Proteine nachgewiesen.

2.9 Transkriptionsanalyse

2.9.1 RNA-Isolierung

Nach 6 h Infektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und je Zellkulturschale (Ø 10 cm) 5 ml TRI Reagent (Sigma) zur sofortigen Zelllyse zugegeben. Die Zelllysate wurden gründlich abgeschabt, in Falconröhrchen überführt und bei -70°C bis zur RNA-Isolierung gelagert.

Die Zelllysate wurden aufgetaut und 15 min bei RT inkubiert. Je Ansatz wurden 10% BCP (Bromchlorpropan) zugegeben, kurz umgeschwenkt und erneut 15 min bei RT inkubiert. Die Phasengleichgewichtseinstellung erfolgte bei 3200 xg und 4°C für 45 min.

Die wässrige RNA-haltige Phase eines jeden Ansatzes wurde in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und nach Zugabe von 1 ml Isopropanol je ml wässriger Phase und 1 µl LPA (linear polyacrylamid) je Ansatz erfolgte eine Inkubation bei RT für 15 min. Anschließend wurde bei 4°C und 12.000 xg für 30 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und verworfen, die Gesamt-RNA-Pellets mit 1 ml 75% EtOH gewaschen und in 1 ml 75% EtOH bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert.

2.9.2 Genexpressionsanalyse

Die an die RNA-Isolierung anschließende Probensynthese (cDNA-Synthese, cRNA-Synthese) und Genexpressionsanalyse wurde mit freundlicher Unterstützung von Tanja Töpfer und Robert Geffers (Bereich Mucosale Immunität, GBF) durchgeführt. Hierfür wurde der Human Genom-Chip HG_U133A (22215 Transkripte) der Firma Affymetrix eingesetzt. Die Probensynthese erfolgte nach dem „Technical Manual“ von Affymetrix. Die verwendete Instrumentierung und Analysesoftware (Microarray Suite Version 5.0) stammte ebenfalls von Affymetrix.

2.9.3 Auswertung der Genexpressionsanalyse

Auf Affymetrix GeneChips wird der zu analysierende Sequenzabschnitt durch elf 25-mer Oligonukleotide repräsentiert. Das zum analysierenden Sequenzabschnitt komplementäre Oligonukleotid (*perfect match oligo*, PM) wird direkt neben ein Oligonukleotid mit einer eingefügten Fehlpaarung an Position 13 (*mismatch oligo*, MM) synthetisiert und bildet mit ihm ein Sondenpaar (*probe pair*). Das MM symbolisiert den Hintergrund der spezifischen Hybridisierung, weshalb im Laufe der *in silico* Hybridisierungs-Analyse die Signalintensität des MM von der PM-Signalintensität abgezogen wird. Alle Sondenpaare, die zusammen einen Sequenzabschnitt auf dem GeneChip repräsentieren, werden als SONDENSET (*probe set*) bezeichnet.

Die Auswertung der vergleichenden Expressionsanalysen wurden nach der Vorschrift "GeneChip® Expression Analysis-Data Analysis Fundamentals" (<http://www.affymetrix.com>) durchgeführt. Um signifikant regulierte Gene von nicht signifikant regulierten zu unterscheiden, wurde zunächst die Güte der einzelnen Messergebnisse eines jeden Transkripts bewertet.

Hierzu wurde zuerst die Detektion der Transkripte verwendet. Bei dem Kriterium „Detection“ handelt es sich um eine qualitative Angabe, die eine Beurteilung darüber zulässt, ob ein Signal eines einzelnen Transkripts anwesend (P: present), marginal vorhanden (M) oder abwesend (A: absent) ist. Der Messwert „Detection“ wird sowohl für die Experimentprobe als auch für die Basisprobe durch einen „Detection“-Algorithmus ermittelt, in den die Signalwerte der Oligonukleotid-Sondenpaare eines Transkript-SONDENSETS auf einem Mikroarray einfließen. Die Beurteilung, ob das Signal eines Sondenpaares als anwesend oder abwesend gewertet wird erfolgt durch den Messwert des Sondenpaarsignals (Discrimination-Score R). Liegt die Summe der Discrimination-Scores aller Sondenpaare eines SONDENSETS über einem vorgegebenen Schwellenwert τ (0,015), so wird das Signal als anwesend betrachtet. Dies wird mittels des „Detection p-Value“ ausgedrückt. Je höher die Summe der Discrimination-Scores eines SONDENSETS über τ liegt, desto niedriger ist der „Detection p-Value“ des Transkripts und desto höher die Wahrscheinlichkeit der Anwesenheit eines Signals. Bei p-Werten $<0,04$ gelten die Transkripte als anwesend (P), p-Werte zwischen 0,04 und 0,06 entsprechen einer marginalen Expression (M) und p-Werte $>0,06$ weisen ein Transkript als abwesend (A) aus.

In dieser Arbeit wurden Transkripte, für die keines der Sondenpaare den Wert 'present' ($<0,04$) erreichte, aus der Analyse entfernt.

Die Angabe „Change“ ist eine qualitative Aussage über das Ansteigen oder Abfallen der Genexpression eines einzelnen Transkripts der Experimentprobe in bezug auf die Basisprobe. Die Einteilung erfolgt hier in „Erhöhung“ (Increase: I), „geringe Erhöhung“ (Marginal Increase: MI), „keine Veränderung“ (No Change: NC), „Geringe Verminderung“ (Marginal decrease: MD) und „Verminderung“ (Decrease: D) der Genexpression der Experimentprobe im Vergleich zur Basisprobe. Die Festlegung erfolgt ähnlich wie bei dem Kriterium Detektion über einen „Change p-Value“ (P-Wert), der durch Vergleich der Signalintensitäten der Hybridisierungen der Experimentprobe mit den korrespondierenden Signalintensitäten der Basisprobe erstellt wird. P-Werte $<0,0025$ geben eine erhöhte (I), p-Werte zwischen $0,0025$ und $0,003$ eine kaum erhöhte (MI), p-Werte zwischen $0,003$ und $0,997$ eine nicht veränderte (NC), p-Werte zwischen $0,997$ und $0,9975$ eine kaum verminderte (MD) und p-Werte $>0,9975$ eine verminderte (D) Expression an.

Für die weitere Analyse wurden nur Transkripte benutzt, für die die Software ein erhöhte (I) oder eine verminderte (D) Expression errechnet hatte.

Der Wert „Signal Log Ratio“ schätzt quantitativ die Größenordnung und Richtungsänderung eines Transkriptes in der Experimentprobe im Vergleich zur Basisprobe ab. Hierfür wird der Logarithmus zur Basis 2 eingesetzt. Eine Hochregulation um den Faktor 2 entspricht einem Signal Log Ratio-Wert von 1, eine abfallende Regulation um den Faktor 2 einem Signal Log Ratio-Wert von -1.

Für die weitere Analyse wurden nur Transkripte verwendet, die eine Mindeständerung von Faktor ± 2 (entspricht Signal Log >1 und <-1) vorwiesen.

Informationen über regulierte Transkripte wurden der Human Protein Reference Database (<http://www.hprd.org>) und der OMIM, der Online Mendelian Inheritance in Man-Datenbank der NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM&itool=toolbar>), entnommen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung von kovalent-gebundenen Zellwandproteinen von *Listeria monocytogenes*

Die Oberflächenproteine von *Listeria monocytogenes* können aufgrund der Art ihrer Oberflächenbindung in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Die P60-ähnlichen Proteine, Proteine mit GW-Modulen oder hydrophobem Anker sind über ihre C-Termini, die Lipoproteine über ihre N-terminalen Lipidmodifikation an die Oberfläche nicht-kovalent gebunden (Cabanes *et al.*, 2002). Die einzigen bekannten Gruppen der kovalent-gebundenen Proteine sind die 41 LPXTG-Proteine und SvpA, das - wie erst kürzlich gezeigt - durch Sortase B an das Peptidoglycan gebunden wird (Bierne *et al.*, 2004). Die LPXTG-Proteine sind von großem Interesse, da viele dieser Proteine an der Virulenz von Gram-positiven Bakterien beteiligt sind (für Übersichtsartikel siehe: Navarre and Schneewind, 1999).

Das Enzym, das LPXTG-Proteine an die Zelloberfläche bindet, wurde 1999 bei *Staphylococcus aureus* identifiziert und Sortase A genannt (Mazmanian *et al.*, 1999). Das membrangebundene Enzym Sortase A schneidet LPXTG-Proteine zwischen dem Threonin- und Glycin-Rest des LPXTG-Motivs und bindet den Threoninrest kovalent an die meso-Diaminopimelinsäure von Zellwandvorläufermolekülen (Dhar *et al.*, 2000).

Die in diesem Kapitel beschriebene Arbeit hatte zum Ziel, die hypothetische Funktion der listeriellen Sortase A, die Bindung der LPXTG-Proteine an die Zelloberfläche von *L. monocytogenes*, zu bestätigen. Hierfür stand eine *srtA*-Deletionsmutante von Hélène Bierne zur Verfügung (Bierne *et al.*, 2002b).

In ersten Experimenten wurde versucht, die LPXTG-Proteine im Überstand von Kulturen der $\Delta srtA$ -Mutante mittels 2D-Gelelektrophorese nachzuweisen, da ohne die Bindung an die Zellwand eine Freisetzung der Proteine erwartet wurde. Es konnten jedoch keinerlei zusätzlichen Proteinspots in 2D-Gelen von Kulturüberständen der *srtA*-Deletionsmutante erkannt werden (Daten nicht gezeigt).

Daher wurde der Ansatz gewählt, die Zellwände von *Listeria monocytogenes* wt, der $\Delta srtA$ - und der komplementierten $\Delta srtA$ -Mutante zu isolieren und mit harschen Bedingungen (4% SDS, 4% Mercaptoethanol) von nicht-kovalent gebundenen Proteinen zu reinigen. Die verbleibenden Proteine wurden mit Trypsin verdaut und

die Peptidgemische mit ESI-Q-TOF MS analysiert. Aufgrund der hohen Komplexität der Proben konnten durch Massenspektrometrie nur wenige Proteine identifiziert werden. Daher wurden in späteren Versuchen die Peptidgemische mittels einer μ -HPLC fraktioniert und anschließend die einzelnen Fraktionen mit ESI-Q-TOF MS analysiert. Alle doppelt- und dreifach-geladenen Peptidionen wurden automatisch durch die Software ausgewählt und durch MS/MS fragmentiert, um eine möglichst hohe Abdeckung zu erhalten. Tabelle 3.1 zeigt die identifizierten Proteine im *L. monocytogenes* wt und in der Δ srtA-Mutante.

Tabelle 3.1: Identifizierte Proteine in den Zellwandfraktionen von *L. monocytogenes* wt und Δ srtA

Protein	Funktion/Ähnlichkeit	wt	Δ srtA
InIA	Internalin A, LPXTG-Motiv	X	
Lmo0130	5'-Nukleotidase, LPXTG-Motiv	X	
Lmo0514	Ähnlich zu Internalin, LPXTG Motiv	X	
Lmo0880	Unbekannt, LPXTG-Motiv	X	
Lmo1666	Cadherin und Hyalin Domäne, LPXTG-Motiv	X	
Lmo2714	Unbekannt, LPXTG-Motiv	X	
Lmo2185	SvpA, NEAr-Transporter	X	X
Lmo2186	NEAr-Transporter	X	X
Iap	P60, invasion associated protein Iap	X	X
Lmo2637	Unbekannt, Konserviertes Lipoprotein	X	X
Eno	Enolase	X	X
Gap	Glyceraldehyd 3-phosphate dehydrogenase	X	X
GroEL	Klasse I Hitzeschockprotein (chaperonin) GroEL	X	X
Hup	DNA-bindendes Protein HU	X	X
Pgk	Phosphoglycerat kinase	X	
RpsC	Ribosomal protein S3	X	
RpsJ	Ribosomal protein S10	X	X
RpsM	Ribosomal protein S13		X
RplL	Ribosomal protein L12	X	X
RpsH	Ribosomal protein S8		X
RpsL	Ribosomal protein S12	X	
RpsP	Ribosomal protein S16	X	
Tsf	Translation Elongationsfaktor	X	
TufA	Translation Elongationsfaktor EF-Tu	X	X
DnaK	Klasse I Hitzeschockprotein DnaK	X	
Lmo2828	Unbekannt		X
Lmo2523	DNA-bindendes Protein		X

Insgesamt wurden im wt und in der $\Delta srtA$ -Mutante 27 Proteine identifiziert, von denen 12 nur im wt und 4 nur in der *srtA*-Deletionsmutante detektiert wurden. Sechs der im wt identifizierten Proteine tragen ein LPXTG-Signal (InIA, Lmo0130, Lmo0514, Lmo0880, Lmo1666, Lmo2714). In der *srtA*-Deletionsmutante konnten keine LPXTG-Protein nachgewiesen werden. Die Möglichkeit, dass die Peptidionen durch Ionensuppression an den entsprechenden Massen versteckt blieben, wurde untersucht, indem MS/MS von Proben der $\Delta srtA$ -Mutante an jenen Massen durchgeführt wurde, bei denen im wt LPXTG-Proteine identifiziert worden waren. Trotzdem konnten in der $\Delta srtA$ -Mutante keinerlei LPXTG-Proteine nachgewiesen werden (Abb. 3.1). In der *in trans* mit *srtA* komplementierten Mutante $\Delta srtA$ p*SrtA* konnten auf diese Weise die entsprechenden LPXTG-Proteine nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), was bestätigt, dass die Bindung dieser Proteinklasse von Sortase A abhängt.

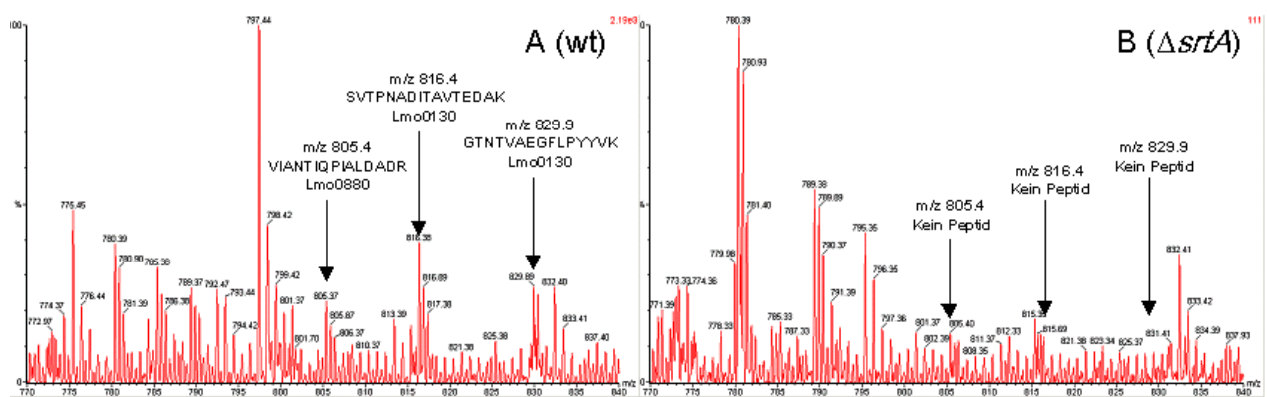


Abb. 3.1: ESI Q-TOF Massenspektren von tryptischen Peptiden kovalent-gebundener Zellwandproteine von *L. monocytogenes*.

Im Spektrum des wt (A) sind drei Peptidionen markiert, die nach MS/MS den LPXTG-Proteinen Lmo0880 und Lmo0130 zugeordnet werden konnten. Im Spektrum von Zellwandproteinen einer $\Delta srtA$ -Mutante (B) sind die Peptide nicht vorhanden.

Weitere durch MS nachgewiesene Proteine waren zumeist ribosomale Proteine, die vermutlich aufgrund ihrer Hydrophobizität schwer abzutrennen sind, sowie Chaperone, Glykolyse-Enzyme und Iap.

Einzig die Anwesenheit von Lmo2185 und Lmo2186, die zueinander strukturell ähnlichen und in einem hypothetischen Operon angelegten NEAr-Transporter (Andrade *et al.*, 2002), überraschte. Beide Proteine wurden durch viele Peptide und in großen Mengen nachgewiesen, tragen aber kein LPXTG-Motiv. Kürzlich wurde jedoch von Bierne *et al.* (Bierne *et al.*, 2004) gezeigt, dass Lmo2185 (SvpA) von einer Sortase B an die Zellwand gebunden wird.

3.2 Charakterisierung der sekretorischen Proteine von *Listeria monocytogenes*

Mikrobielle Proteine, die mit Wirtsproteinen interagieren, müssen aus dem Cytosol nach außen transportiert werden und anschließend entweder an die Zelloberfläche gebunden oder in die Umgebung sekretiert werden. Auch die Oberflächenproteine von *Listeria* spielen für die Pathogenität eine wichtige Rolle. Nach den kovalent-gebundenen Proteinen (diese Arbeit, Kapitel 3.1), den Zellwand-assoziierten Proteinen (Schaumburg, 2003) und den Lipoproteinen (Baumgärtner, 2004) sind auch die sekretorischen Proteine ein Subproteom von großem Interesse. Vier der sieben primären Virulenzfaktoren des Virulenzgenclusters und der Internaline, Hly, PlcA, PlcB und Mpl, werden sekretiert. Durch die Untersuchung des Sekretoms, des Überstands der bakteriellen Kultur, mittels Proteommethode konnten Proteine identifiziert werden, die eine mögliche Beteiligung an der Virulenz von *Listeria monocytogenes* haben.

Bioinformatische Vorhersage der Sekretionssignale

Eine korrekte Vorhersage, ob ein Protein sekretiert wird oder nicht, ist schwierig. Zwar sind eine Reihe von Computerprogrammen, die auf den bekannten experimentellen Ergebnissen basieren, für die Vorhersage von Signalpeptiden (SP) öffentlich zugänglich, aber alle führen auch zu falsch-positiven und falsch-negativen Vorhersagen (Menne *et al.*, 2000). Während der Annotation des Genoms von *Listeria monocytogenes* durch das Europäische *Listeria* Genom Konsortium wurde das Programm SignalP verwendet. SignalP ist zwar den anderen Programmen in der Vorhersage der nicht-sekretorischen Proteine überlegen, jedoch bei der Vorhersage der sekretorischen Proteine unterlegen (Menne *et al.*, 2000). Hinzu kommt, dass die Vorhersage der Signalpeptide auf die ersten 70 AS beschränkt ist und Transmembran-Domänen (TMD) ignoriert werden. Deshalb wurde in Zusammenarbeit mit Uwe Kärst (GBF, Braunschweig) eine verbesserte Signalpeptid-Vorhersage mit 7 verschiedenen öffentlich zugänglichen Programmen durchgeführt (Trost *et al.*, im Druck).

Für die Vorhersage wurden alle kodierenden Sequenzen (coding sequences, CDS) des listeriellen Genoms mittels zwei SignalP-Programmen (Heijne's weight matrix method (HMM) und neural network (NN) von SignalP 2.0.b2) untersucht und die erhaltenen CDS anschließend mit fünf weiteren Programmen (SigCleave, Sosui Signal beta, PSort I, iPSort, AnTheProt) analysiert (für Referenzen siehe Webseiten-Referenzen). CDS bzw. deren jeweiligen Proteine, die von mindestens 3 von den 7 Programmen als sekretiert vorhergesagt wurden, wurden einer weiteren Analyse unterzogen. Diese 525 CDS, die in Klassen 7-3 eingeteilt wurden (je nach Anzahl der Programme, die eine Sekretion vorhersagten), wurden weiter unterteilt in Gene, die einerseits für integrale und assoziierte Membranproteine (255) und andererseits für exportierte Proteine (270) kodieren (Tabelle 3.2). Diese wiederum wurden unterteilt in oberflächengebundene und sekretorische Proteine. 132 Proteine mit bekannten Retentionssignalen wie Lipoproteine, Proteine mit hydrophoben Ankern, LPXTG-Signalen, GW-Modulen oder P60-ähnliche Proteine wurden als oberflächengebunden markiert. Von den restlichen 138 putativ sekretierten Proteinen widersprach für 17 Proteine die Annotation einer Sekretion. Mit diesem Ansatz konnten somit 121 Proteine als vermutlich sekretiert vorhergesagt werden (Tabelle 3.2, Anhang Tabellen 8.2-8.4) (Trost *et al.*, im Druck). Im Gegensatz dazu wurden in der Veröffentlichung des Genoms (Glaser *et al.*, 2001) lediglich 86 Proteine vorhergesagt.

Tabelle 3.2: Bioinformatische Vorhersage von Sekretionssignalen von *L. monocytogenes*

Klasse	Putative Sekretions-signale	Integrale & assoziierte Membran-proteine	Putativ exportierte Proteine	Putativ Zellwand-assozierte Proteine	Putativ sekretierte Proteine	Putativ sekretierte Proteine (nach manueller Überprüfung)
7	105	19	86	60	26	24
6	188	79	109	52	57	50
5	137	89	48	18	30	25
4	60	38	22	2	20	17
3	35	30	5	0	5	5
Σ	525	255	270	132	138	121

Experimentelle Untersuchung des listerielle Sekretoms

Diese verbesserte Vorhersage bildete die Grundlage für eine Untersuchung des Kulturüberstands mit Proteommethoden. Es sind mindestens sechs verschiedene Sekretionswege für Gram-positive Bakterien bekannt: der Sec- (Oliver and Beckwith, 1982), der Tat- (Chaddock *et al.*, 1995), der Pseudopilin- (Bleves *et al.*, 1998), der ABC-Transporter- (Koronakis and Hughes, 1993), der ESAT-6-Sekretionsweg (Pallen, 2002) und der SecA2-Sekretionsweg (Braunstein *et al.*, 2001). Die zur Zeit erhältlichen Computerprogramme zur Vorhersage von Signalpeptiden erkennen jedoch nur die Signalpeptide für den Sec- und den funktionell sehr ähnlichen Tat-Sekretionsweg. Obwohl über diese beiden Wege der Großteil aller Proteine sekretiert wird (van Wely *et al.*, 2001), können sekretorische Faktoren auch über andere Wege nach außen gelangen und somit eine wichtige Rolle für die Pathogenität von *L. monocytogenes* spielen. Die Anwesenheit eines Proteins im Kulturüberstand hängt jedoch von vielen Faktoren ab. So ist die Menge des Proteins nicht nur von der Expression, sondern auch von der Effektivität des Exports, der Anbindung an die Zelloberfläche und der Proteolyse abhängig.

Für die Identifizierung der sekretorischen Proteine wurde der EGD-e Stamm verwendet, dessen Genom 2001 vom Europäischen *Listeria* Genom Konsortium sequenziert wurde (Glaser *et al.*, 2001). Um eine höhere Expression der Virulenzfaktoren zu erhalten, wurden die *Listeria*-Stämme in Minimalmedium (Premaratne *et al.*, 1991) bis zur späten exponentiellen Phase angezogen. In Vollmedium (BHI) war nur eine geringe Expression der bekannten Virulenzfaktoren gesehen worden (Daten nicht gezeigt). Eine ähnliche Induktion der Virulenzgene wurde auch schon für Hungerbedingungen (Bohne *et al.*, 1994) und bei Aktivkohle-Zusatz in BHI beschrieben (Geoffroy *et al.*, 1989; Ripio *et al.*, 1996). Zusätzlich zur Expression der Virulenzfaktoren änderte sich durch die Anzucht in Minimalmedium auch die Expression von einigen anderen Proteinen, vornehmlich Substrattransportern (Daten nicht gezeigt).

Die Bakterien wurden bei einer $OD_{600}=1,1$ abzentrifugiert, der Kulturüberstand wurde filtriert und die Proteine durch TCA gefällt. Um möglichst viele Proteine des Überstandes zu identifizieren, wurden sowohl 2D-Gelelektrophorese als auch HPLC-MS/MS benutzt.

Abbildung 3.2 zeigt ein 2D-Gel von Proteinen des Kulturüberstands von *Listeria monocytogenes* EGD-e im Bereich von pH 4-7. Aus diesem 2D-Gel und einem Gel mit dem pH-Bereich von 7-10 (Abbildung 8.1, Anhang) wurden insgesamt 130 Spots ausgestochen, wovon 120 durch MALDI TOF MS und Post-Source Decay (PSD) identifiziert wurden. Diese ergaben 58 verschiedene Proteine. In den 2D-Gelen erschienen viele Proteine als sogenannte 'Ladungsketten', d.h. sie fokussierten in mehreren Spots. Diese entstehen aufgrund unterschiedlicher pI-Werte der jeweiligen Isoformen eines Proteins. Diese unterschiedlichen Proteinspezies waren vermutlich auf posttranslationale Modifikationen oder auf Artefakte durch TCA-Fällung bzw. Desulfurierung der Cysteine während der ersten Dimension zurückzuführen (Herbert *et al.*, 2003).

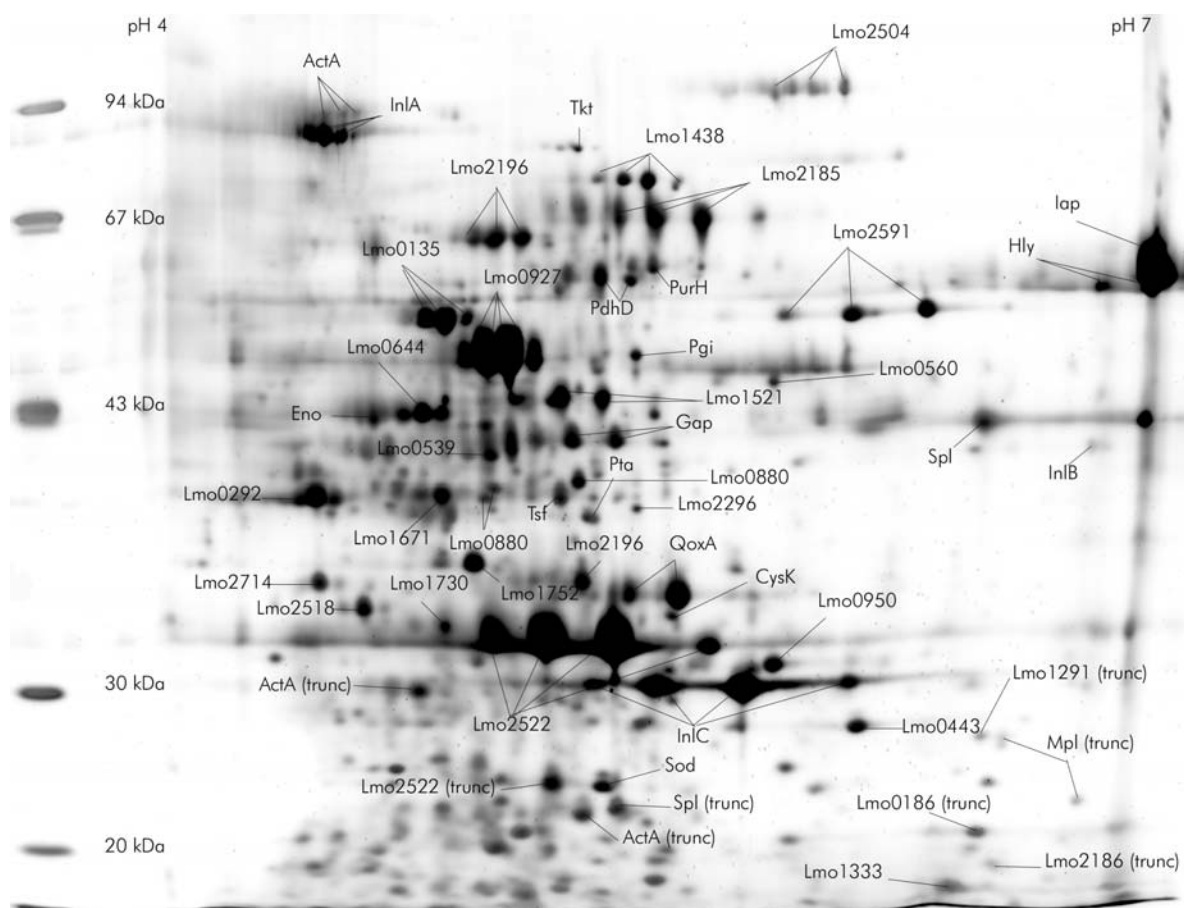


Abb. 3.2: RuBPS-gefärbtes 2D-Gel der Überstandsproteine von *L. monocytogenes* EGD-e wt. Eine Auswahl der Proteine, die durch MALDI-TOF MS identifiziert wurden, sind gekennzeichnet.

In einem zweiten Ansatz wurden die Proteine des listeriellen Sekretoms mittels HPLC-MS/MS identifiziert. In insgesamt 19 verschiedenen Versuchen wurden unterschiedliche Mengen Protein auf die nano-HPLC aufgetragen und 106 Proteine

mit den Standardeinstellungen des Programmes MASCOT (Version 1.9) identifiziert. Durch manuelles Überprüfen der Massenspektrometrie-Daten und strengere Anforderungen an die Identifizierung, um falsch-positive Identifizierungen zu vermeiden (siehe Methoden-Teil), wurden 14 Identifizierungen verworfen. Von diesen 92 Proteinen wurden 45 auch durch 2D-Gelelektrophorese identifiziert. Insgesamt wurden durch beide Ansätze 105 verschiedene Proteine im Sekretom von *Listeria monocytogenes* identifiziert.

Mehr als die Hälfte (54) aller im Sekretom identifizierten Proteine sind als extrazellulär lokalisiert vorhergesagt (Tabelle 3.3), während 51 Proteine kein bekanntes Sekretionssignal besitzen (Tabelle 3.4).

Es konnten alle primären Virulenzfaktoren mit einem Sekretionssignal (ActA, Hly, InlA, InlB, InlC, Mpl, PlcA, PlcB) im Kulturüberstand identifiziert werden. Insgesamt wurden 28 Proteine der Gruppe der sekretierten und zelloberflächengebundenen Proteine identifiziert: zwei aus der P60-Familie (Spl, Iap), sechs besitzen GW-Motive (InlB, Ami, Lmo1076, Lmo1216, Lmo1521, Lmo2591), fünf enthalten ein LPXTG-Motiv (InlA, InlH, Lmo0880, Lmo1666, Lmo2714) und drei haben einen hydrophoben Anker (ActA, Lmo2185, Lmo2186). Die restlichen Proteine haben keine oder unbekannte Retentionssignale.

Des weiteren wurden 12 vorhergesagte Lipoproteine identifiziert (Lmo0135, Lmo0152, Lmo0153, Lmo1068, Lmo1671, Lmo1738, Lmo1847, Lmo2079, Lmo2196, Lmo2349, Lmo2416, Lmo2637, QoxA, TcsA), wobei die meisten putative Substrat-bindende Proteine von ABC-Transportern sind. Vier Lipoproteine haben keine bekannte Funktion. Von den restlichen Proteinen mit Sekretionssignal sind sechs ohne bekannte Funktion, drei sind Transkriptionsregulatoren, eins ist homolog zu Lipasen, eins ist an der Zellteilung beteiligt und eins hat Ähnlichkeit zu Proteinen der Flagellenbiosynthese.

Tabelle 3.3: Identifizierte Proteine mit Sekretionssignal im Kulturüberstand von *L. monocytogenes*

Name	Funktion/Ähnlichkeit [§]	Det. bei [ng]*	PrfA-Box	SP Vorher.
Spezifische Virulenzfaktoren				
ActA	Actin-assembly inducing protein	25	Ja	5
Hly	Listeriolysin O	25	Ja	7
InlA	Internalin A (LPXTG motif)	50	Ja	6
InlB	Internalin B (GW motif)	50	(Ja)	4
InlC	Internalin C	25	Ja	5
Mpl	Zinc metalloproteinase	200	Ja	6
PlcA	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C	50	Ja	6
PlcB	Phospholipase C	25	(Ja)	7
Zelloberflächenproteine und Metabolismus der Zellwand				
Ami	Autolysin (GW motif)	100	Nein	6
lap	P60 extracellular protein, invasion associated protein lap	25	Nein	6
InlH	Internalin H ^{21M} (LPXTG motif)	50	Nein	7
Lmo0880	Peptidoglycan anchored protein (LPXTG motif)	50	Nein	7
Lmo1076	Autolysin (GW motif)	200	Nein	7
Lmo1216	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (GW motif)	200	Nein	5
Lmo1521	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (GW motif)	50	Nein	7
Lmo1666	Unknown, Cadherin & Hyalin domain (LPXTG motif)	200	Ja	6
Lmo1851	Carboxy-terminal processing proteinase ^{2D}		Nein	3
Lmo1883	Chitinase ^{2D}		Nein	7
Lmo2185	NEAr transporter	50	Nein	6
Lmo2186	NEAr transporter ^{2D}		Nein	6
Lmo2504	Cell wall binding protein	50	Nein	7
Lmo2522	Cell wall binding protein	25	Nein	7
Lmo2591	N-acetylmuramidase (GW motif)	100	Ja	6
Lmo2691	N-acetylmuramidase MurA	50	Nein	3
Lmo2714	Peptidoglycan anchored protein (LPXTG motif)	100	Nein	7
Lmo2754	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (penicillin-binding protein 5)	100	Nein	5
Pbp	Penicillin-binding protein ^{2D}		Nein	3
Spl	Peptidoglycan lytic protein P45	25	Nein	6
Transporter, Lipoproteine und Energiestoffwechsel				
Lmo0135	Oligopeptide ABC transporter (binding protein)	50	Nein	7
Lmo0152	Oligopeptide ABC transporter (binding protein) ^{2D}		Nein	7
Lmo0153	High-affinity zinc ABC transporter	25	Nein	6
Lmo1068	Unknown, probable lipoprotein	100	Nein	6
Lmo1671	ABC transporter and adhesion protein	100	Nein	6
Lmo1738	Amino acid ABC transporter (binding protein)	50	Nein	7
Lmo1847	LpeA, similar to adhesion binding proteins and lipoproteins with multiple specificity for metal cations (ABC transporter)	100	Ja	6
Lmo2079	Unknown, probable lipoprotein	100	Nein	7
Lmo2196	Pheromone ABC transporter (binding protein)	50	Nein	6
Lmo2349	Amino acid ABC transporter (binding protein)	100	Nein	7
Lmo2416	Unknown, probable lipoprotein	50	Nein	7
Lmo2637	Unknown, conserved lipoprotein	100	Nein	7
QoxA	AA3-600 quinol oxidase subunit II ^{21M}	25	Nein	5
TcsA	CD4+ T cell-stimulating antigen, lipoprotein	50	Nein	6
Zellteilung und Flagellen				
Lmo0217	Probable septum formation initiator	100	Nein	3
Lmo0680	Flagellum biosynthesis protein FlhA ^{71M}	200	Nein	6
Entgiftung und Adaption an untypische Bedingungen				
Lmo0950	Lipase ^{2D}		Ja	6
Regulation und Sensing				
Lmo0443	Transcription regulator, LytR Family	50	Nein	4
Lmo1061	Two-component sensor histidine kinase ^{21M}	100	Nein	5
Lmo2518	Transcription regulator, LytR Family	50	Ja	6
Unbekannt				
Lmo1303	Unknown, similar to B. subtilis YneA protein	100	Nein	6
Lmo1333	Unknown, similar to B. subtilis YqzC protein	25	Nein	5
Lmo1715	Unknown	50	Nein	4
Lmo1752	Unknown ^{2D}		Nein	7
Lmo2156	Unknown	200	Nein	7
Lmo2410	Unknown ^{31M}	200	Nein	6

[§] = Funktion aus Lismo Datenbank und InterPro; TM = Anzahl der Transmembrandomänen, ^{2D} = nur in 2D PAGE gefunden,

* = Menge an Protein notwendig zur Identifizierung mittels LC/MS

Tabelle 3.4: Identifizierte Proteine ohne Sekretionssignal im Kulturüberstand von *L. monocytogenes*

Zelloberflächenproteine und Metabolismus der Zellwand				
Lmo0129	Autolysin	100	Nein	
Lmo1080	<i>B. subtilis</i> minor teichoic acids biosynthesis protein GgaB	50	Nein	
Lmo1291	Acytransferase ^{101M}	200	Nein	
Lmo2550	Glycosyl transferase ^{21M}	50	Nein	
Transporter, Lipoproteine und Energiestoffwechsel				
KdpB	Potassium-transporting ATPase b chain ^{7TM}	200	Nein	
PtsH	PTS phosphocarrier protein Hpr	200	Nein	
Entgiftung und Adaption an untypische Bedingungen				
Lmo0395	GCN5-related N-acetyltransferase	100	Nein	
Lmo0644	Sulfatase/phosphatase ^{51M}	100	Nein	
Lmo0927	Sulfatase/phosphatase ^{41M}	25	Nein	
Lmo0943	Non-heme iron-binding ferritin Fri	50	Nein	
Lmo2016	Major cold-shock protein	100	Nein	
Sod	Superoxide dismutase	50	Nein	
Chaperone				
DnaK	Heat-shock protein DnaK	100	Nein	
GroEL	Heat-shock protein GroEL	100	Nein	
GroES	Heat-shock protein GroES	50	Nein	
Lmo0292	Heat-shock protein htrA serine protease ^{2D}		Nein	
Lmo1580	Universal stress protein UspA	200	Nein	
Regulation und Sensing				
Lmo0526	Transcription regulator, MerR family	50	Nein	
Lmo2795	Transcription regulator, RpiR family	200	Nein	
Proteinsynthese (Elongation)				
RplD	Ribosomal protein L4	50	Nein	
RpsF	Ribosomal protein S6	100	Nein	
RplL	Ribosomal protein L12	50	Nein	
Tsf	Translation elongation factor	50	Nein	
TufA	Elongation factor EF-Tu	50	Nein	
DNA-bindende Proteine				
Hup	Histone-like bacterial DNA-binding protein HU	50	Nein	
Kohlenhydratmetabolismus				
Eno	Enolase	50	Nein	
Gap	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	50	Nein	
Pgk	Phosphoglycerate kinase	200	Nein	
Tkt	Transketolase ^{2D}		Nein	
Aminosäuremetabolismus				
CysK	Cysteine synthase	200	Ja	
GlyA	Glycine hydroxymethyltransferase	200	Nein	
Lmo0560	NADP-specific glutamate dehydrogenase ^{2D}		Nein	
Lmo2425	Glycine cleavage system protein H	100	Nein	
Nukleotid- und Nukleinsäuremetabolismus				
PurB	Adenylosuccinate lyase	200	Nein	
PurE	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase I	200	Nein	
PurH	Bifunctional phosphoribosylaminoimidazole carboxy formyl formyltransferase and inosine-monophosphate cyclohydrolase	100	Nein	
Spezifische Stoffwechselwege				
Lmo0539	Tagatose-1,6-diphosphate aldolase ^{2D}		Nein	
Lmo1867	Pyruvate phosphate dikinase	50	Nein	
PduL	Propanediol utilization protein	100	Nein	
Pfk	6-phosphofructokinase	200	Nein	
Pta	Phosphotransacetylase ^{2D}		Nein	
Unbekannt				
LmaA	Antigen A	50	Nein	
Lmo0119	Unknown	100	Nein	
Lmo0186	Unknown, similar to <i>B. subtilis</i> YabE protein ^{2D}		Nein	
Lmo0796	Unknown	100	Nein	
Lmo0900	Unknown	200	Nein	
Lmo1125	Unknown	100	Nein	
Lmo1395	Unknown	50	Nein	
Phagenproteine				
Lmo2287	Putative tape-measure [Bacteriophage A118] ^{41M}	200	Nein	
Lmo2296	Coat protein [Bacteriophage SPP1]	200	Nein	
Lmo2297	Putative scaffolding protein [Bacteriophage A118]	50	Nein	

Die 51 Proteine ohne vorhergesagtes Sekretionssignal sind zumeist cytosolische Proteine. Hierzu zählen die Proteine des Kohlenhydrat- (4), des Aminosäure- (4) und Nukleotid- und Nukleinsäurestoffwechsels (3), sowie spezifische Stoffwechselwege (5). Aber auch Proteine des Proteinsyntheseapparates (5) und Chaperone (5), sowie Transkriptionsregulatoren (2), ein DNA-bindendes Protein und Proteine, die an Entgiftung und der Adaption an untypische Bedingungen beteiligt sind (6), wurden identifiziert. 4 Proteine haben überraschenderweise vorhergesagte Zellwandfunktionen, zwei Proteine sind membrangebundene Transporter, drei sind Phagenproteine und sieben Proteine sind von unbekannter Funktion (Klassifizierung nach Glaser *et al.*, 2001) (Tabelle 3.4).

Posttranslationale Modifikationen

In der 2D-Gelelektrophorese lässt sich - im Vergleich zur LC-MS/MS-Technologie - das Vorhandensein posttranslatiionaler Modifikationen von Proteinen leichter nachweisen. Eine Abspaltung von Signalpeptiden oder anderen Domänen kann zu einer Änderung des pI-Wertes und der Masse des Proteins führen. Modifikationen wie Phosphorylierung wiederum führen durch die zusätzlichen Ladungen zu einem veränderten pI des Proteins und damit zu einer Verschiebung in der ersten Dimension. Da im Sekretom auch mehrere Proteasen identifiziert wurden und die Anzucht über 17 h dauerte, wurden wie erwartet auch einige proteolytische Fragmente von Proteinen identifiziert. Dies waren zumeist Fragmente von Proteinen, die in großer Menge im Sekretom vorhanden waren, wie z.B. Spl (siehe Abb. 3.2).

Die pI-Werte und die Massen der meisten Proteine des listeriellen Sekretoms entsprachen jedoch den theoretischen Werten. Nur 6 Proteine erschienen mit erheblich kleineren Massen als erwartet: Lmo0927 (4 TMD), Lmo0644 (5 TMD) sowie QoxA (2 TMD) waren um ihre N-terminalen Transmembran-Domänen (TMD) verkürzt. Zwei der Transkriptionsregulatoren mit Sekretionssignal (Lmo0443 und Lmo2518) wurden ohne N-terminale Peptide bis Aminosäure 60 bzw. 98 identifiziert. Die Masse von Lmo0292, einer Serin-Protease, war mit 40 kDa etwa 12 kDa kleiner als erwartet und es wurden nur wenigen Peptide des C-Terminus detektiert.

Für ein Ortholog von Lmo0927, das Protein YfnI in *B. subtilis*, ist bekannt, dass es direkt nach seinen 5 TMD durch die Typ I Signalpeptidase SipT geschnitten wird

(Hirose *et al.*, 2000; Antelmann *et al.*, 2001). Lmo0927 und das strukturell, wie auch funktionell verwandte Protein Lmo0644, die beide als Sulfatasen bzw. Phosphatase vorhergesagt werden, scheinen beide auf ähnliche Weise prozessiert zu werden.

Zusätzlich zu diesen beiden Proteinen wurden fünf weitere im Sekretom identifiziert, die mehr als zwei TMD besitzen: Lmo1291 (10 TMD), KdpB (7 TMD), Lmo0680 (7 TMD), Lmo2287 (4 TMD) and Lmo2410 (3 TMD). Für keines dieser Proteine konnte ein Peptid aus den Membrandomänen durch Massenspektrometrie identifiziert werden.

3.3 Identifizierung von PrfA-abhängigen Proteinen im Sekretom von *Listeria monocytogenes*

PrfA ist ein DNA-bindender Transkriptionsregulator, unter dessen Kontrolle alle wichtigen listeriellen Virulenzfaktoren stehen. Aufgrund der nur geringen Expression des Virulenzgenclusters und der Internaline in einer *prfA*-Deletionsmutante ist diese nicht mehr virulent. Zur Identifizierung unbekannter PrfA-abhängiger, sekretorischer Proteine, die möglicherweise zur Virulenz von *L. monocytogenes* beitragen, wurden die Sekretome von *L. monocytogenes* EGD-e wt und einer isogenen *prfA*-Deletionsmutante (Domann *et al.*, 1992) untersucht. Beide Kulturen wuchsen vergleichbar und wurden nach 17 h Wachstum in der späten exponentiellen Phase bei einer $OD_{600}=1,1$ geerntet (Abb. 3.3). Die Proteine der Kulturüberstände beider Stämme wurden mit TCA gefällt und durch 2D-Gelelektrophorese und HPLC-MS-Expressionsanalyse analysiert (Abb. 3.2 & Anhang Abb. 8.2).

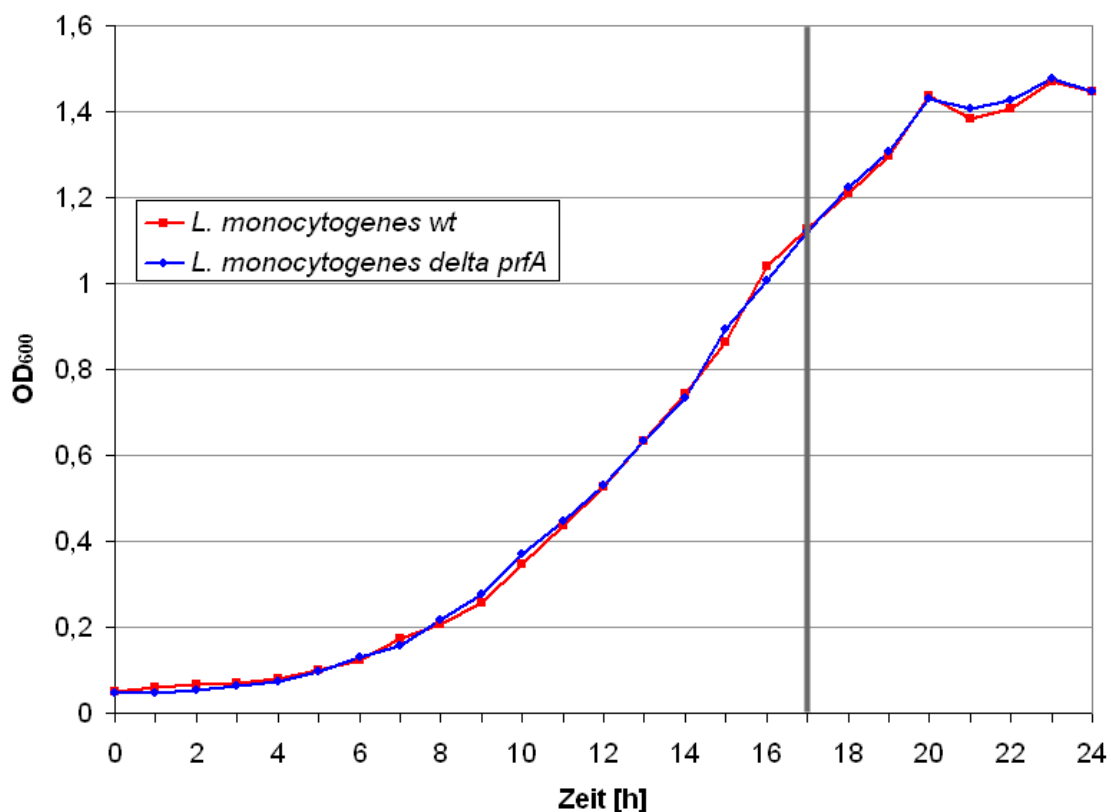


Abb. 3.3: Wachstumskurven von *L. monocytogenes* EGD-e wt (blau) und $\Delta prfA$ (rot) in Minimalmedium.

Nach 17 h wurden die Kulturüberstände in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet und die Proteine durch TCA gefällt.

Für die genomweite Suche nach PrfA-Bindestellen standen eine Fehlstellenanalyse (Glaser *et al.*, 2001) und eine Weight-Matrix Analyse (R. Münch, TU Braunschweig, unveröffentlichte Daten) zur Verfügung.

Für die 2D-PAGE-Expressionsanalyse wurden für jeden Stamm (EGD-e wt und $\Delta prfA$) vier unabhängige Experimente miteinander verglichen und mit Hilfe der 2D-Software Proteomweaver 2.0 (Definiens) analysiert. Die diskontinuierlichen Expressionsanalysen (DEA) basierend auf LC/MS wurden mit je vier unabhängig voneinander gewonnenen Überstandsproteinfraktionen, die wiederum in vier unterschiedliche Konzentrationen (25 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng) verdünnt wurden, durchgeführt.

Die Auswertung der Expressionsdaten aus den 2D-Gelexperimenten erwies sich aufgrund von Spotüberlagerungen und Proteolysefragmenten als sehr komplex. Trotzdem war es durch Computer-gestützte Analyse möglich Expressionsdaten für eine Reihe von Proteinen zu erhalten.

Tabelle 3.5 zeigt die durch 2D-Gele und Diskontinuierliche Expressionsanalyse (DEA) LC-MS/MS Experimente gefundenen PrfA-regulierten Proteine. Insgesamt waren im wt 21 Proteine hochreguliert und zwei reprimiert. 18 der 21 hochregulierten Proteine besitzen ein Sekretionssignal. Die beiden reprimierten Proteine besitzen beide eine vorhergesagte cytosolische Lokalisation, d.h. ihre Anwesenheit im Überstand könnte auf experimentelle Artefakte zurückzuführen sein.

Der stärkste Expressionsunterschied zwischen den beiden Stämmen war für Internalin C (InIC) zu erkennen (Abbildung 3.4). Für dieses Protein ergab eine Computeranalyse eine Repression in der $\Delta prfA$ -Mutante um den Faktor 12.

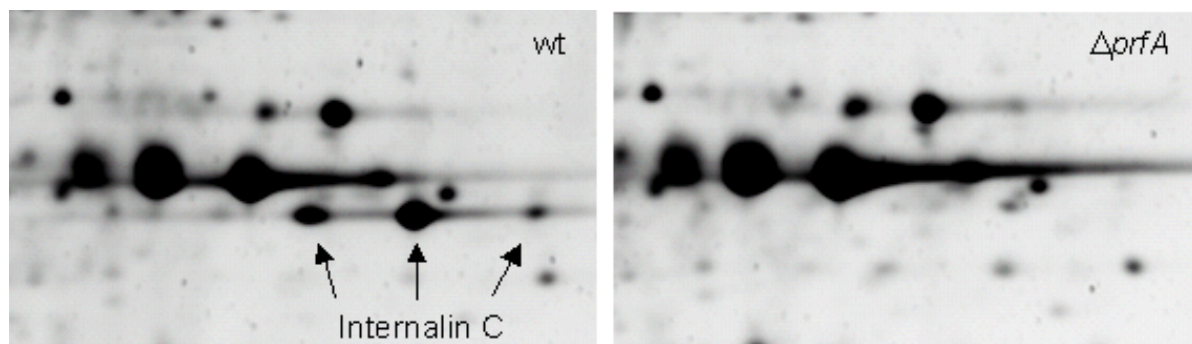


Abb. 3.4: Differentielle Expression von Internalin C im Sekretom von *L. monocytogenes* EGD-e wt (links) und $\Delta prfA$ (rechts).

Ausschnitt aus RuBPS-gefärbten 2D-Gelen. Durch Software-gestützte Analyse wurde für Internalin C ein Expressionsunterschied von 12 erhalten.

Tabelle 3.5: PrfA-regulierte Proteine im Kulturüberstand von *L. monocytogenes***A: Im wt hochregulierte Proteine / durch PrfA positiv reguliert (nach Gen-Nummer sortiert)**

Gene	Funktion/Ähnlichkeit	Regulation 2D	Regulation LC-MS	SP	PrfA-Box
Lmo0153	Zinc ABC transporter		+++	6	Nein
PlcA	Phosphatidylinositol-specific phospholipase c		+++!	6	Ja
Hly	Listeriolysin	(+++)*	+++!	7	Ja
Mpl	Zinc metalloproteinase precursor	>+!	>+!	7	Ja
ActA	Actin-assembly inducing protein	(+++)*	+++!	5	Ja
PlcB	Phospholipase C		+++!	7	{Ja}
Lmo0292	Heat-shock protein htrA serine protease	+			Nein
InlA	Internalin A (LPXTG motif)	(++)*	+++	6	Ja
InlB	Internalin B (GW module)	(+++)	+++	4	{Ja}
Lmo0560	NADP-specific glutamate dehydrogenase	+			Nein
Lmo1521	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, TonB dependent, bacterial SH3-domain	+		7	Nein
Lmo1715	Unknown		++!	4	Nein
PurH	Bifunctional phosphoribosylaminoimidazole carboxy formyl formyltransferase and inosine-monophosphate cyclohydrolase	+	+		Nein
InlC	Internalin C	+++*	+++	5	Ja
Lmo2196	OppA, Pheromone ABC transporter (binding protein)	++*		6	Nein
Lmo2349	Amino acid ABC transporter (binding protein)	+	+	7	Nein
Lmo2504	Cell wall binding peptidase	+		7	Nein
Lmo2518	Transcription regulator, LytR Family	+	+	6	Ja
Lmo2591	N-acetylmuramidase (GW module)	++	+	6	Ja
Lmo2691	N-acetylmuramidase (MurA)	+	++	3	Nein
Lmo2754	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (penicillin-binding protein 5)		++!	5	Nein

B: In der $\Delta prfA$ -Mutante hochregulierte Proteine / durch PrfA negativ reguliert

Gene	Funktion/Ähnlichkeit	Regulation 2D	Regulation LC-MS	SP	PrfA-Box
Ctc	General stress protein		--!		Nein
FbaA	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase		--!		Nein

(): Quantifizierung schwierig durch Spotüberlagerungen und Proteolyse

*: Mehrere Spots wurden addiert

{}: Gen ist im Operon PrfA-reguliert

!: Protein war im anderen Stamm nicht detektierbar

Das Experiment bestätigte die PrfA-Abhängigkeit aller primären Virulenzfaktoren mit einem Sekretionssignal und damit den experimentellen Aufbau. Die Genprodukte des Virulenzgenclusters (PlcA, Hly, Mpl, ActA, PlcB) sind strikt PrfA-reguliert (Sheehan *et al.*, 1995) und waren alle nicht in der *prfA*-Deletionsmutante zu detektieren. Das ist

bemerkenswert, da Hly, PlcA, PlcB und ActA in großen Mengen im wt-Überstand vorhanden waren und selbst bei der höchsten Verdünnung (25 ng) in den DEA-Experimenten identifiziert werden konnten. Die Metalloprotease Mpl ist der einzige essentielle Virulenzfaktor, der nur bei den größten Proteinmengen in DEA detektiert werden konnte. Dies weist darauf hin, dass Mpl nur in geringen Mengen exprimiert wird. In der *prfA*-Deletionsmutante konnte Mpl nicht identifiziert werden, so dass für dieses Protein kein Expressionsfaktor ermittelt werden konnte.

InlA, InlB und InlC konnten alle in der $\Delta prfA$ -Mutante identifiziert werden, wenn auch in deutlich geringeren Mengen als im wt. Das lässt vermuten, dass auch andere transkriptionelle Regulatoren die Expression dieser Gene beeinflussen. Hierfür wurde kürzlich der Stressregulator sigma B (σ^B) vorgeschlagen (Kazmierczak *et al.*, 2003; Milohanic *et al.*, 2003) (siehe Diskussion).

Überraschenderweise wurden im wt nur zwei weitere Proteine (Lmo2591 und Lmo2518) mit vorhergesagten PrfA-Bindestellen (jeweils mit 2 Fehlstellen verglichen zur perfekten palindromischen Sequenz) als positiv reguliert detektiert im Vergleich zu $\Delta prfA$. Lmo2591 ist von großem Interesse, da es - wie InlB - zu der kleinen Gruppe von Proteinen gehört, die mit GW-Modulen an die Zelloberfläche gebunden werden. Für den N-terminalen Teil dieses Proteins wurde eine Amidasefunktion annotiert. Außerdem besitzt es eine Homologie zu dem Flagellenprotein FlgJ. Die Funktion des 57 kDa-Proteins ist unbekannt.

Lmo2518 ist als Transkriptionsregulator der LytR-Familie vorhergesagt und besitzt ein Sekretionssignal. Die genaue Funktion von Lmo2518 ist jedoch unbekannt.

Interessanterweise wurden auch Proteine ohne vorhergesagte PrfA-Bindestellen vom wt gegenüber der *prfA*-Deletionsmutante verstärkt sekretiert. Dazu gehören Lmo0153, ein Substrat-bindendes Lipoprotein eines putativen ABC-Transporters mit Ähnlichkeiten zu Adhesin B von *Streptococcus pyogenes*, Lmo1715, das vermutlich eine Methylase-Funktion besitzt, und Lmo2754, eine Carboxypeptidase mit Ähnlichkeiten zu Penicillin-bindenden Proteinen. Aber auch MurA (Lmo2691), eine Muramidase, deren Beteiligung an der Zellseparation und Autolyse kürzlich beschrieben wurde (Carroll *et al.*, 2003), erscheint im Sekretom als PrfA-abhängig. Die Expression dieser Proteine könnte von PrfA indirekt reguliert werden, wie auch schon für andere Gene durch Transkriptionsanalysen gezeigt wurde (Milohanic *et al.*, 2003). Eine weitere Möglichkeit wäre eine indirekte Abhängigkeit über die Regulation von Transportern wie SecA2 (Lenz and Portnoy, 2002).

Eines der wenigen Proteine, das in den 2D-PAGE Experimenten als hochreguliert gefunden wurde, war OppA, das im wt-Sekretom 5fach mehr vorhanden war als im Sekretom der $\Delta prfA$ -Mutante. OppA ist ein Lipoprotein und Teil eines Oligopeptidtransporters und hat Einfluss auf das intrazelluläre Überleben von *Listeria* (Borezee *et al.*, 2000). In den LC-MS/MS-Experimenten konnte jedoch nur eine schwache Regulation festgestellt werden. Der Grund hierfür ist unbekannt, könnte aber an einer spezifischen posttranslationalen Modifikation in einer der beiden Stämme liegen, wobei diese Proteinspezies nicht in den 2D-Gelen detektiert werden konnte.

Von den restlichen 6 Proteinen, die entweder durch 2D-PAGE oder LC-MS/MS im wt als hochreguliert identifiziert wurden, fällt vor allem PurH auf. PurH, das am Nukleotidmetabolismus beteiligt ist, wurde auch schon als hochreguliert in intrazellulären *Listeria* beschrieben (Klarsfeld *et al.*, 1994) und könnte an der Verwertung der wirtseigenen Nukleotide beteiligt sein.

Es wurden nur zwei Proteine gefunden, die im wt Sekretom herunterreguliert waren: FbaA, die Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase der Glykolyse und Ctc, das „Generelle Stressprotein“. Beide besitzen kein SP und es ist unbekannt, ob sie aktiv nach außen transportiert werden oder durch vermehrte Zelllyse ins Medium gelangten.

In beiden Stämmen wurden jeweils zwei Proteine identifiziert, die zwar vorhergesagte PrfA-Bindestellen haben, aber nicht reguliert erschienen: Lmo0950, ein sekretiertes Protein mit Ähnlichkeiten zu Lipasen, und CysK, die Cysteinsynthase.

Zwei weitere Proteine mit vorhergesagten PrfA-Bindestellen (Lmo1847 und Lmo1666) waren an der unteren Nachweisgrenze in LC-MS-Experimenten detektiert worden. Eine zuverlässige Expressionsanalyse konnte daher nicht durchgeführt werden.

3.4 Identifizierung von *Listeria monocytogenes*-spezifischen Proteinen im Sekretom

Alle bisher identifizierten essentiellen Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* haben zwei Eigenschaften: sie stehen unter transkriptioneller Kontrolle durch PrfA und die entsprechenden Gene sind in der apathogenen Art *L. innocua* nicht vorhanden. Daher wurde nach der Proteomanalyse PrfA-regulierter Überstandsproteine auch eine Untersuchung der *L. monocytogenes*-spezifischen Proteine durchgeführt.

Hierzu wurden Überstandsproteine von *L. monocytogenes* und *L. innocua* nach Anzucht in Minimalmedium (Premaratne *et al.*, 1991) durch TCA gefällt, in Ammoniumbicarbonat gelöst und über HPLC-MS/MS identifiziert.

Beide Kulturen hatten einen vergleichbaren zeitlichen Wachstumsverlauf, *L. innocua* erreicht seine Stationärphase schon bei einer geringeren optischen Dichte von 1,1 (Abb. 3.5). Die Überstandsproteine wurden in der späten exponentiellen Phase der Kulturen bei $OD_{600}=1,1$ (*L. monocytogenes*) bzw. $OD_{600}=0,9$ (*L. innocua*) erhalten.

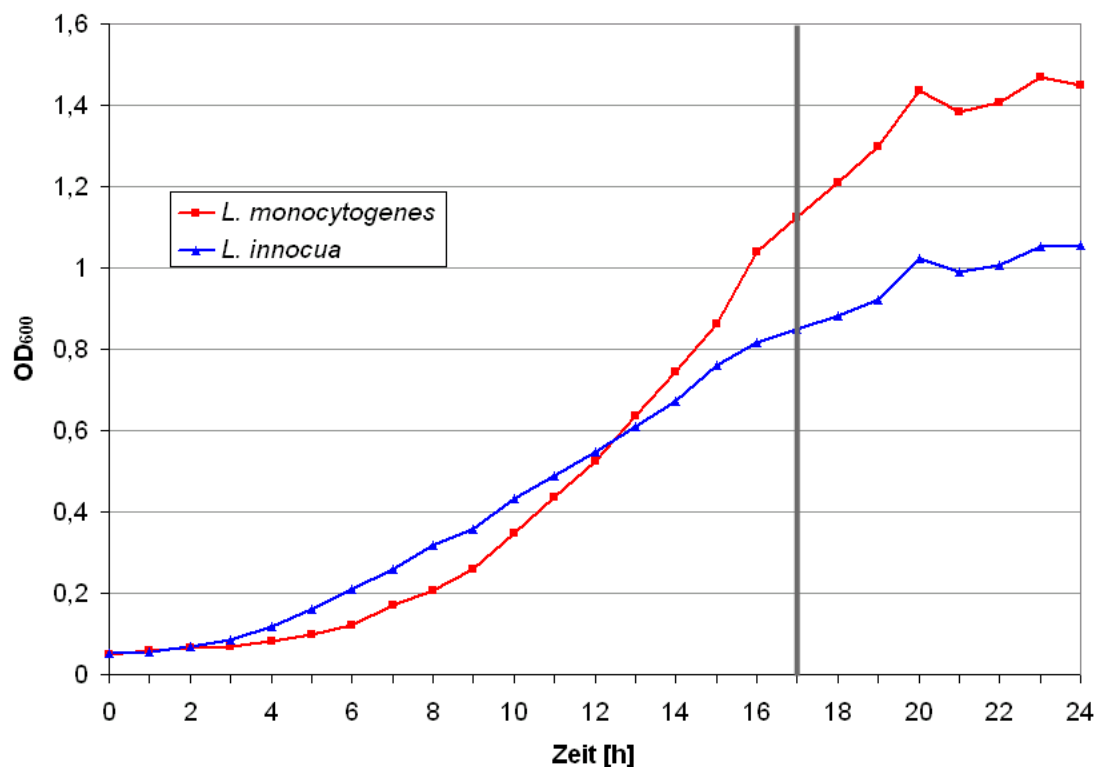


Abb. 3.5: Wachstumskurven von *L. monocytogenes* EGD-e wt (blau) und *L. innocua* CLIP11262 wt (rot) in Minimalmedium.

Nach 17 h wurden die Kulturüberstände in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet und die Proteine durch TCA gefällt.

Im Überstand von *L. monocytogenes* wurden 105 Proteine (Tabellen 3.3 & 3.4), im Überstand von *L. innocua* 96 Proteine (Tabelle 8.1 Anhang) identifiziert. Ungefähr die Hälfte aller Proteine (46) war in beiden Arten vorhanden. Von den 59 Proteinen spezifisch für *L. monocytogenes* besaßen 16 Proteine kein Ortholog in *L. innocua* (Tabelle 3.6 & 3.7). 50 Proteine waren spezifisch für *L. innocua*, 7 hiervon hatten kein Ortholog in *L. monocytogenes* (Tabelle 8.1, Anhang).

9 der 16 identifizierten *L. monocytogenes*-spezifischen Proteine ohne Ortholog in *L. innocua* gehören zu den essentiellen Virulenzfaktoren (ActA, Hly, Mpl, PlcA, PlcB) und Internalinen (InlA, InlB, InlC, InlH), womit die Zuverlässigkeit des Experimentansatzes bestätigt wird.

Zu den übrigen 7 Proteinen zählen eine hypothetische Glykosyltransferase (Lmo1080) mit Homologien zu dem kleinen Teichonsäure-Biosyntheseprotein GgaB, das Autolysin Auto (Lmo1076), das über GW-Module an die Zellwand gebunden ist, und Lmo1666, ein Protein unbekannter Funktion mit einer hypothetischen Hyalin- und Cadherindomäne. Lmo1666, ein 184 kDa-Protein, das eine PrfA-Bindestelle besitzt, wird über ein LPXTG-Motiv an die Zelloberfläche gebunden (vgl. Kapitel 3.1). Die restlichen 4 Proteine sind ein Phagenprotein (Lmo2296), zwei Proteine unbekannter Funktion (Lmo1125 and Lmo2410) und eine Zwei-Komponenten Sensor-Histidin-Kinase (Lmo1061) (Tabelle 3.6).

Unter den 43 Proteinen, die in *L. monocytogenes* spezifisch exprimiert werden und ein Ortholog in *L. innocua* besitzen (Tabelle 3.7), befinden sich 8 Zelloberflächenproteine. Diese sind Lmo0880, ein LPXTG-Protein mit einer hypothetischen Collagen-bindenden Domäne, Lmo1291, eine Acyltransferase mit 10 Transmembrandomänen, das Penicillin-bindende Protein Pbp, die Carboxypeptidase Lmo1851, die Chitinase Lmo1883, Lmo2591, eine Muramidase mit GW-Modulen und Lmo2754, ein hypothetisches Penicillin-bindendes Protein.

Tabelle 3.6: *L. monocytogenes*-spezifische Überstandsproteine ohne Ortholog in *L. innocua*

Name	Funktion/Ähnlichkeit	Ortholog	PrfA-Box	SP Vorher.
Spezifische Virulenzfaktoren				
ActA	Actin-assembly inducing protein		Ja	5
Hly	Listeriolysin O		Ja	7
InlA	Internalin A (LPXTG motif)		Ja	6
InlB	Internalin B (GW module)		(Ja)	4
InlC	Internalin C		Ja	5
Mpl	Zinc metalloproteinase		Ja	6
PlcA	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C		Ja	6
PlcB	Phospholipase C		(Ja)	7
Zelloberflächenproteine und Metabolismus der Zellwand				
InlH	Internalin H ^{2TM} (LPXTG motif)		Nein	7
Lmo1076	Autolysin (GW motif)		Nein	7
Lmo1080	Minor teichoic acids biosynthesis protein GgaB		Nein	
Lmo1666	Unknown, Cadherin & Hyalin domain (LPXTG motif)		Ja	6
Regulation und Sensing				
Lmo1061	Two-component sensor histidine kinase ^{2TM}		Nein	5
Unbekannt				
Lmo1125	Unknown		Nein	
Lmo2410	Unknown ^{3TM}		Nein	6
Phagenproteine				
Lmo2296	Coat protein [Bacteriophage SPP1]		Nein	

Des weiteren sind fünf Proteine aus der Gruppe der Transporter und Lipoproteine spezifisch in *L. monocytogenes* exprimiert. Aus dieser Gruppe ist insbesondere das Lipoprotein LpeA (Lmo1847) von Interesse, da für dieses eine PrfA-Abhängigkeit gezeigt werden konnte (Schaumburg, 2004). Weiterhin wurden zwei Proteine aus der Gruppe der Zellteilung und Flagellenproteine identifiziert sowie 4 Proteine aus der Gruppe 'Entgiftung und Adaption an untypische Bedingungen', wozu auch Lmo0950 gehört, eine hypothetische Lipase mit Homologien zur *B. subtilis* LipA/B Lipase und einer vorhergesagten PrfA-Bindestelle. Drei Proteine sind transkriptionelle Regulatoren oder Sensoren (Lmo0443, Lmo0526, Lmo2795), 14 Proteine sind Bestandteil des Stoffwechsels, der Proteinsynthese oder Chaperone, 5 Proteine besitzen keine bekannte Funktion und 2 sind Phagenproteine (Tabelle 3.7).

In der nicht-pathogenen Art *L. innocua* wurden 7 spezifische Proteine ohne Orthologe bei *L. monocytogenes* identifiziert: Lin0661, ein Protein mit Ähnlichkeiten zu den Internalinen, der ABC-Transporter Lin0307, ein Autolysin mit GW-Modulen (Lin1064), ein Transkriptionsregulator der Mer-Familie (Lin1622), zwei Proteine mit unbekannter Funktion (Lin1090, Lin1210) und ein Phagenprotein (Lin2576) (Anhang, Tabelle 8.1).

Tabelle 3.7: *L. monocytogenes*-spezifische Überstandsproteine mit Ortholog in *L. innocua*

Zelloberflächenproteine und Metabolismus der Zellwand				
Lmo0880	Peptidoglycan anchored protein (LPXTG motif)	Lin0879	Nein	7
Lmo1291	Acytransferase ^{10TM}	Lin1329	Nein	
Pbp	Penicillin-binding protein ^{2D}	Lin1477	Nein	3
Lmo1851	Carboxy-terminal processing proteinase ^{2D}	Lin1965	Nein	3
Lmo1883	Chitinase ^{2D}	Lin1996	Nein	7
Lmo2550	Glycosyl transferase ^{2TM}	Lin2695	Nein	
Lmo2591	N-acetylmuramidase (GW motif)	Lin2738	Ja	6
Lmo2754	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (penicillin-binding protein 5)	Lin2897	Nein	5
Transporter, Lipoproteine und Energiestoffwechsel				
Lmo1671	ABC transporter and adhesion protein	Lin1779	Nein	6
Lmo1847	LpeA, adhesion binding protein and lipoprotein with multiple specificity for metal cations (ABC transporter)	Lin1961	Ja	6
Lmo2349	Amino acid ABC transporter (binding protein)	Lin2443	Nein	7
Lmo2416	Unknown, probable lipoprotein	Lin2511	Nein	7
KdpB	Potassium-transporting ATPase b chain ^{7TM}	Lin2819	Nein	
Zellteilung und Flagellen				
Lmo0217	Probable septum formation initiator	Lin0249	Nein	3
Lmo0680	Flagellum biosynthesis protein FlhA ^{7TM}	Lin0688	Nein	6
Entgiftung und Adaption an untypische Bedingungen				
Lmo0395	GCN5-related N-acetyltransferase	Lin0413	Nein	
Lmo0644	Sulfatase/phosphatase ^{5TM}	Lin0647	Nein	
Lmo0950	Lipase ^{2D}	Lin0949	Ja	6
Lmo2016	Major cold-shock protein	Lin2124	Nein	
Chaperone				
Lmo0292	Heat-shock protein htrA serine protease ^{2D}	Lin0320	Nein	
Lmo1580	Universal stress protein UspA	Lin1615	Nein	
Regulation und Sensing				
Lmo0443	Transcription regulator, LytR family	Lin0463	Nein	4
Lmo0526	Transcription regulator, MerR family	Lin0530	Nein	
Lmo2795	Transcription regulator, RpiR family	Lin2927	Nein	
Proteinsynthese (Elongation)				
RplD	Ribosomal protein L4	RplD	Nein	
RpsF	Ribosomal protein S6	RpsF	Nein	
Kohlenhydratmetabolismus				
Tkt	Transketolase ^{2D}	Tkt	Nein	
Aminosäuremetabolismus				
Lmo0560	NADP-specific glutamate dehydrogenase ^{2D}	Lin0569	Nein	
Lmo2425	Glycine cleavage system protein H	Lin2519	Nein	
Nukleotid- und Nukleinsäuremetabolismus				
PurB	Adenylosuccinate lyase	PurB	Nein	
PurE	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase I	PurE	Nein	
PurH	Bifunctional phosphoribosylaminoimidazole carboxy formyl formyltransferase and inosine-monophosphate cyclohydrolase	PurH	Nein	
Spezifische Stoffwechselwege				
Lmo0539	Tagatose-1,6-diphosphate aldolase ^{2D}	Lin0543	Nein	
Lmo1867	Pyruvate phosphate dikinase	Lin1981	Nein	
PduL	Propanediol utilization protein	PduL	Nein	
Pta	Phosphotransacetylase ^{2D}	Pta	Nein	
Unbekannt				
Lmo0796	Unknown	Lin0789	Nein	
Lmo0900	Unknown	Lin0899	Nein	
Lmo1395	Unknown	Lin1432	Nein	
Lmo1715	Unknown	Lin1826	Nein	4
Lmo2156	Unknown	Lin2260	Nein	7
Phagenproteine				
Lmo2287	Putative tape-measure [Bacteriophage A118] ^{4TM}	Lin0119	Nein	
Lmo2297	Putative scaffolding protein [Bacteriophage A118]	Lin0108	Nein	

Weiterhin wurden 43 Proteine detektiert, die zwar Orthologe besitzen, aber spezifisch in *L. innocua* exprimiert werden und damit für den spezifischen Lebensstil dieses Bakteriums wichtig sein könnten. Darunter 6 Zellwandproteine (Lin0141, Lin0177, Lin0461, Lin0636, Lin1328, Lin2055), wovon 4 ein LPXTG-Motiv besitzen. Außerdem 5 Transporter und Phosphotransferase-System (PTS)-Proteine (Lin0143, Lin0841, Lin1002, Lin2472, Lin2525), 3 Flagellenproteine (FlaA, Lin0707, Lin0714), 2 Proteine, die an der Zellteilung beteiligt sind (Lin0236, FtsZ), ein Protein für die Adaption an untypische Bedingungen (Lin1103), 2 Regulatoren (Lin0031, Lin1807), 2 Proteine der Proteinsynthese (Lin0987, Lin2052), 8 Proteine unbekannter Funktion (Lin0173, Lin0225, Lin0318, Lin0567, Lin0683, Lin0784, Lin0908, Lin1864), ein Phagenprotein (Lin0174) und 13 Stoffwechselproteine (Ldh, Lin0449, PdhD, Lin1413, PykA, Lin2355, Pgi, Tpi, FbaA, Lin0263, GlnA, Lin1552, Prs) (Tabelle 8.1, Anhang).

3.5 Charakterisierung der Wirtszellantwort nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* durch Methoden der Funktionellen Genomanalyse

Während die primären Virulenzfaktoren (siehe Kapitel 1.1.1) von *L. monocytogenes* gut charakterisiert sind, weiß man wenig über die unmittelbare Wirtszellantwort auf listerielle Invasion und Infektion. Bisher sind erst zwei Publikationen erschienen, die die allgemeine Wirtszellantwort untersuchten, beide mittels Transkriptomics (Cohen *et al.*, 2000; Baldwin *et al.*, 2003).

Um die Wirtszellantwort auf eine listerielle Invasion auf der Proteinebene zu untersuchen, wurde eine Analyse mittels Proteommethoden durchgeführt. Die Wirtszellantwort wurde durch listerielle Infektion von Zellkulturen und durch die Präsentation spezifischer listerieller Oberflächenproteine stimuliert.

3.5.1 Untersuchung von Gesamtzellextrakten von *Listeria* infizierten Wirtszellen

Für die Untersuchung der Wirtszellantwort auf Infektion mit *L. monocytogenes* wurden 6×10^6 HeLa-Zellen in 10 cm-Petrischalen mit *Listeria monocytogenes* wt, $\Delta actA$ oder $\Delta prfA$ mit einer „Multiplicity of Infection“ (MOI) von 50 für 6 h infiziert.

Die Zugabe des *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ -Stammes diente als Kontrolle. Durch die geringe Expression der Gene des Virulenzgenclusters und der Internaline, kann die $\Delta prfA$ -Mutante zwar an die HeLa-Zellen adhärieren, aber in diese nicht eindringen, wie durch mikroskopische Untersuchungen festgestellt werden konnte. Die Anwesenheit von extrazellulären Bakterien induzierte eine stressbedingte Wirtszellantwort, die von einer durch die PrfA-abhängigen Virulenzgene und durch die eingedrungenen Bakterien verursachten Wirtszellantwort unterschieden werden sollte.

Die $\Delta actA$ -Mutante von *L. monocytogenes* ist befähigt, eukaryontische Zellen zu invasieren, kann sich jedoch aufgrund der fehlenden Aktinpolymerisation nicht intrazellulär fortbewegen und somit keine Nachbarzellen infizieren. Durch einen Vergleich der Infektion mit *L. monocytogenes* wt bzw. $\Delta actA$ sollten Aufschlüsse auf

beteiligte Wirtszellproteine an dem bisher am wenigsten untersuchten Mechanismus der Zell-Zell-Ausbreitung erhalten werden.

In den ersten Experimenten wurden die infizierten Zellen mit Quellschmelze (siehe Kapitel 2.5.1) aufgeschlossen, um Gesamtzelllysate zu erhalten und eine möglichst vollständige Untersuchung der Wirtszellproteine zu ermöglichen. Die Fokussierung der Proteine während der 1. Dimension misslang jedoch und resultierte in 2D-Gelen von schlechter Qualität. Verantwortlich für die Probleme während der IEF waren vermutlich durch die Lyse freigesetzte, geladene Zellbestandteile wie z.B. DNA und Salze, die eine Fokussierung von Proteinen verhinderten.

Um eine Verbesserung der Fokussierung zu erreichen, wurde eine geringere Proteinmenge auf die Gele aufgetragen. Zur Detektion der Proteine wurde daher in weiteren Proteomuntersuchungen der Nachweis der Protein über metabolisches Labelling mit den radioaktiven Aminosäuren [³⁵S]-Cystein und [³⁵S]-Methionin durchgeführt. Durch die gleichzeitige Zugabe von *Listeria* und den radioaktiven Aminosäuren zu den Zellkulturen sollten außerdem Unterschiede in der Neusynthese von Wirtszellproteinen in infizierten und nicht-infizierten Zellen identifiziert werden. Hierzu wurden HeLa-Zellen in 6-Loch-Platten (~7x 10⁵ Zellen) angezogen und mit *Listeria monocytogenes* wt, $\Delta actA$ oder $\Delta prfA$ mit einer MOI von 50 infiziert. Auch dem Zellkulturmedium einer Kontrollschale nicht-infizierter HeLa-Zellen wurden die radioaktiven Aminosäuren zugegeben. Nach 6 Stunden Infektion wurden die Zellen gewaschen, abgeschabt und mit Quellschmelze lysiert.

Für die IEF wurde ein pH-Gradient von 3-10 benutzt, um einen möglichst großen Ausschnitt des Gesamtproteoms zu erhalten. Die Gele wurden nach der 2. Dimension fixiert, mit RuBPS (Rabilloud *et al.*, 2001) gefärbt und anschließend getrocknet. Die Detektion der radioaktiven Proteine fand durch Auflegen der Gele auf „Verstärkerfolien“ für 3 Tage statt. Abbildung 3.6 zeigt den Vergleich zweier Autoradiogramme von *L. monocytogenes* wt-infizierten und $\Delta prfA$ -infizierten HeLa-Zellen.

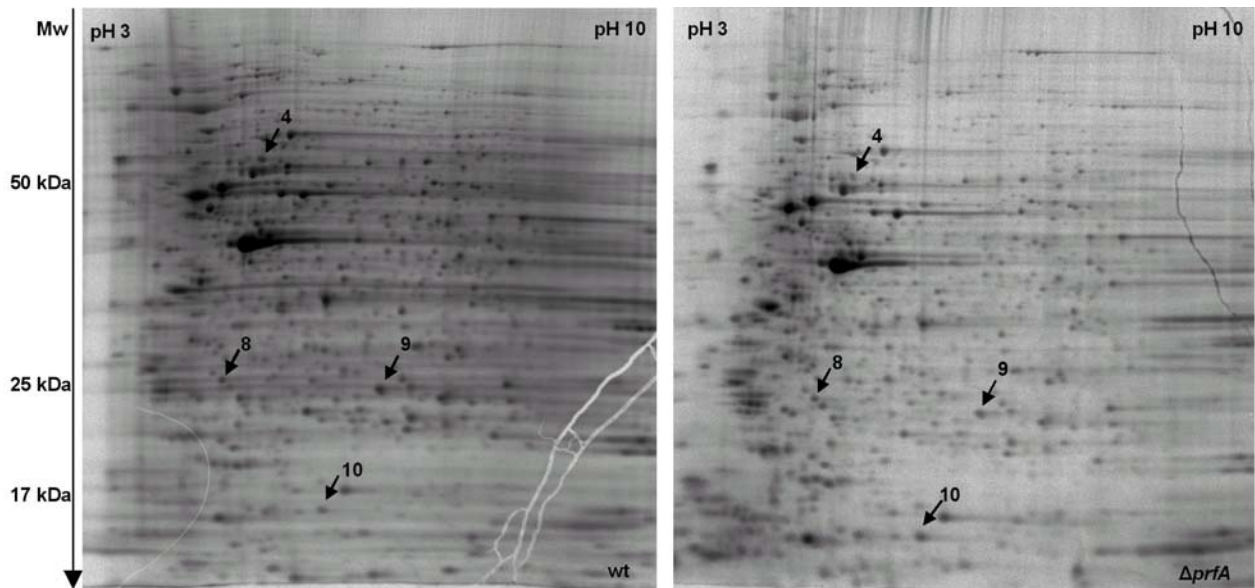


Abb. 3.6: ^{35}S -Autoradiogramme von *L. monocytogenes* wt-infizierten (links) und mit $\Delta prfA$ stimulierten (rechts) HeLa-Zellen im Bereich von pH 3-10. Vier regulierte Proteine wurden identifiziert und sind gekennzeichnet.

Die 2D-Gele nach metabolischem Labelling konnten nicht mit dem 2D-Gel-Auswerteprogramm Proteomweaver 2.0 verglichen werden, da dieses Programm für die 'weichen' Spotränder von Autoradiogrammen nicht optimiert ist. Die Gelbilder wurden daher manuell mittels des Bildbearbeitungsprogrammes Aida ausgewertet.

Die Autoradiogramme enthielten durchschnittlich 1850 Spots pro Gel. Für 28 Spots konnte eine Regulation festgestellt werden. Die höchste positive Regulation wurde mit ca. +4, die höchste negative Regulation mit ca. -8 bestimmt. Die Spots wurden ausgestochen, die Proteine mit Trypsin verdaut und mittels MS analysiert. Von diesen konnten 4 Proteine identifiziert werden. Tabelle 3.8 zeigt die Regulationen der identifizierten Proteine.

Tabelle 3.8: Identifikationen und Regulationen von unterschiedlich exprimierten Proteinen zwischen *L. monocytogenes* wt und $\Delta prfA$ infizierten HeLa-Zellen nach ^{35}S -Autoradiographie.

Spot-Nr.	Protein (Funktion/Ähnlichkeit)	Acc. Nr.	Regulation
4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	gi 13384620	+3
8	Proteasome alpha 3 subunit	gi 13528948	+4
9	Heat shock protein 27	gi 662841	+2
10	Stathmin	gi 5031851	-8

Drei der identifizierten Proteine waren in HeLa-Zellen, die mit *L. monocytogenes* wt infiziert wurden, hochreguliert. Eine dreifache Induktion erfuhr das „Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K“ (hnRPK). Es wird durch eine Reihe extrazellulärer Signale aktiviert, bindet an das kB-Motiv (Ostrowski *et al.*, 1994) und ist an der Regulation von Transkription und Translation beteiligt (für Übersichtsartikel siehe:

Bomsztyk *et al.*, 2004). hnRPK hat vier bekannte Phosphorylierungsstellen, von denen 3 durch die MAP-Kinase 10 phosphoryliert werden (<http://www.hprd.org>; Peri *et al.*, 2003). Des weiteren wurde für hnRPK eine Rolle während des Zellzyklus impliziert (Dejgaard *et al.*, 1994).

Ebenfalls hochreguliert (Faktor 4) war die α -Untereinheit des Proteasoms. Das Proteasom ist ein Proteasenkomples, der für den selektiven Abbau von überflüssigen oder kurzlebigen Proteinen der Metabolismus- oder Zellzyklusregulation verantwortlich ist (Adams, 2003). Für die α -Untereinheit des Proteasoms ist eine Interaktion mit dem Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor 1A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21, WAV1) bekannt, der ein wichtiger Regulator der Zellzykluskontrolle ist (Touitou *et al.*, 2001).

Für das Hitzeschockprotein 27, das zur Gruppe der kleinen Hitzeschockproteine gehört (Boelens *et al.*, 1998), konnte eine Induktion von 2 bestimmt werden. Die Expression und Aktivierung ist abhängig von einer Reihe von Stimuli wie Hitze, oxidativer Stress oder Cytokine (Lindquist and Craig, 1988; Benn *et al.*, 2002). Nach Stimulation durch Tumor Necrosis Faktor α (TNF α) kann es über die p38-MAP Kinase 2 aktiviert werden (Park *et al.*, 2003).

Die höchste Regulation nach Infektion durch *L. monocytogenes* wt (Faktor: -8) wurde für Stathmin (auch Op18 genannt) gefunden (Abb. 3.7). Stathmin ist ein 17 kDa großes Protein mit vier Serin-Phosphorylierungsstellen, die von einer Reihe von Kinasen phosphoryliert werden können (siehe Kapitel 1.4.2). Die Expression und Phosphorylierung von Stathmin ist gekoppelt an extrazelluläre Signale, die Zellproliferation und -differenzierung regulieren (Sobel, 1991). Es ist an der Depolymerisierung von Mikrotubuli beteiligt, wobei es von Rac1 reguliert wird (Wittmann *et al.*, 2004). Interaktionen von Stathmin wurden mit Tubulin, der KIS-Kinase und dem coiled-coil-Protein RB1CC1 gezeigt (Maucuer *et al.*, 1995).

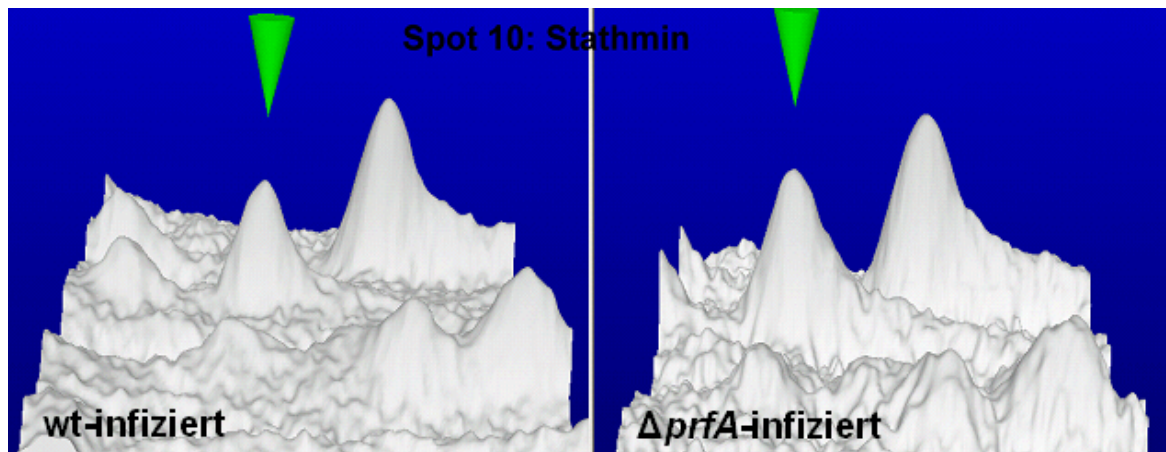


Abb. 3.7: Proteomweaver 3D-Ansicht der Spotvolumen der Autoradiogramme im Bereich um Stathmin.

Stathmin (mit grünem Kegel markiert) ist in mit *L. monocytogenes* wt infizierten HeLa-Zellen (links) deutlich runterreguliert gegenüber der mit $\Delta prfA$ -infizierten Kontrollgruppe (rechts).

In einem Kontrollexperiment wurde die Infektionsrate der HeLa-Zellen durch die verwendeten *Listeria*-Stämme bestimmt. Hierzu wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen angezogen und mit *L. monocytogenes* wt, $\Delta actA$ oder $\Delta prfA$ infiziert. Die Zellen wurden fixiert und intrazelluläre *Listeria* mit dem listerien-spezifischen Antikörper K52 angefärbt, mittels Immunfluoreszenz unter dem Mikroskop analysiert und ausgezählt. Die mit den wt-Listerien infizierten Zellen wiesen eine Infektionsrate von ca. 80% auf, gegenüber ca. 25% bei einer Infektion mit der *actA*-Deletionsmutante (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser geringen Infektionsrate wurde in den folgenden Versuchen auf eine Untersuchung der Wirtszellantwort auf *L. monocytogenes* $\Delta actA$ verzichtet.

3.5.2 Untersuchung Igepal-extrahierter Proteinfractionen von *Listeria*-infizierten Wirtszellen

In den ersten Versuchen der Identifikation von Wirtszellproteinen aus Gesamtzellextrakten konnten nur wenige Proteine identifiziert werden. Um eine größere Anzahl Proteine identifizieren zu können, wurde die Zellmenge erhöht, und die Proteinextrakte wurden einem Reinigungsschritt unterworfen. In den folgenden Experimenten wurde die Lyse der Zellen mit einem 1%igen Igepal-Puffer durchgeführt. Igepal extrahiert in dieser Konzentration cytosolische und Membran-gebundene Proteine (Neugebauer, 1990), läßt aber die Zellkernmembran intakt, so dass DNA und die in sehr grossen Mengen vorhandenen Histone frühzeitig aus der Aufreinigung abgetrennt werden können. Um störende Salze zu entfernen, wurden die Zellextrakte mit Phenol gefällt.

Abbildung 3.8 zeigt ein RuBPS-gefärbtes Gel von Proteinextrakten aus Listerien-infizierten HeLa-Zellen und nicht-infizierten Kontrollzellen. Zwischen den Gelen sind nur wenige Unterschiede erkennbar.

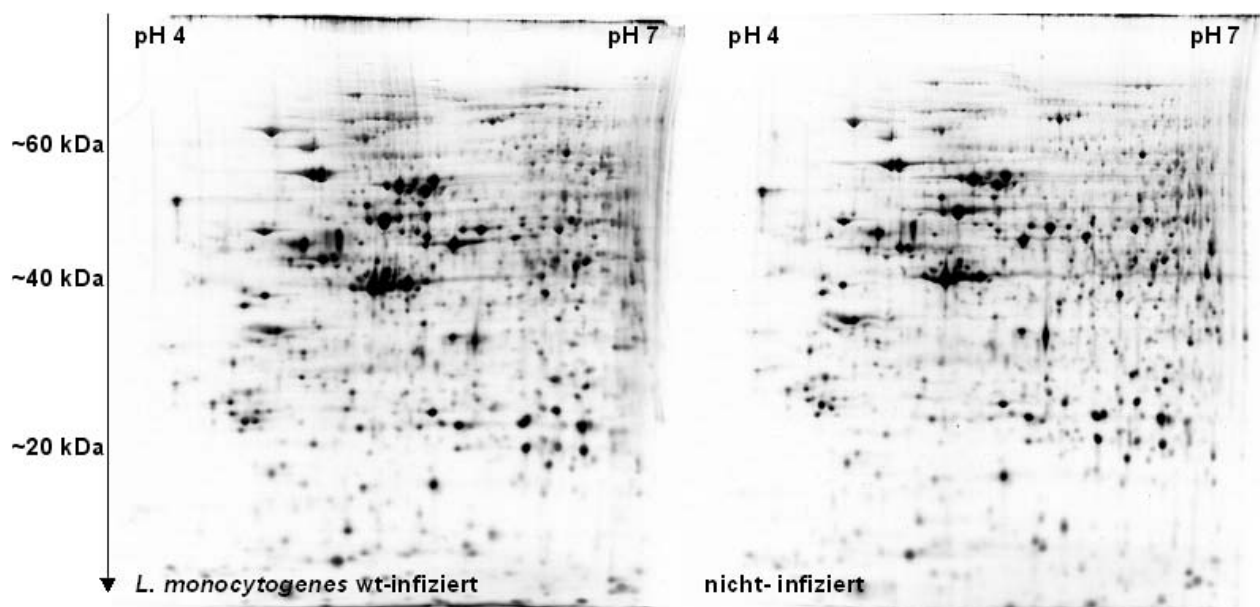


Abb. 3.8: RuBPS-gefärbte 2D-Gele im Bereich von pH 4-7 von Proteinextrakten aus HeLa-Zellen nach 6stündiger Infektion mit *L. monocytogenes* (links) und nicht-infizierten Kontrollzellen (rechts) zeigen wenige Unterschiede.

Schon nach den Versuchen des metabolischen Labellings ergaben erste Hinweise, dass die Wirtszelle im untersuchten Zeitbereich kaum mittels Proteinneusynthese auf die listerielle Infektion reagiert.

Die Proteomuntersuchungen mit den RuBPS-gefärbten Gelen erhärteten den Verdacht, dass die Zelle wahrscheinlich durch Änderungen auf posttranslationaler Ebene auf eine listerielle Infektion antwortet. Daher wurde die Phosphoproteomanalyse etabliert und das Wirtszellproteom auf Veränderungen im Phosphorylierungsmuster nach listerieller Infektion analysiert.

ProQ-Färbung

Eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen eukaryontischer Zellen ist die Phosphorylierung von Proteinen an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten. Um Veränderungen im Phosphorylierungsmuster von Proteinen in mit *L. monocytogenes* infizierten Zellen nachzuweisen, wurden vergleichende 2D-Gelelektrophorese-Experimente von *L. monocytogenes* wt-infizierten und nicht-infizierten HeLa-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden infizierte Zellen in einem Lysepuffer aufgeschlossen, der Natriumfluorid- und Natriumvanadat enthielt, um Phosphatasen und Kinasen zu inhibieren. Zur spezifischen Anfärbung der phosphorylierten Proteine wurde der neue Farbstoff ProQ-Diamond von Molecular Probes verwendet. Mit diesem lassen sich spezifisch Phosphoproteine nachweisen, indem der Farbstoff an phosphorylierte AS-Seitenketten bindet. Anschließend ist eine Färbung aller Proteine durch RuBPS möglich. Abbildung 3.9 zeigt ProQ-gefärbte 2D-Gele im Bereich pH 4-7 von Proteinextrakten aus infizierten und nicht-infizierten HeLa-Zellen.

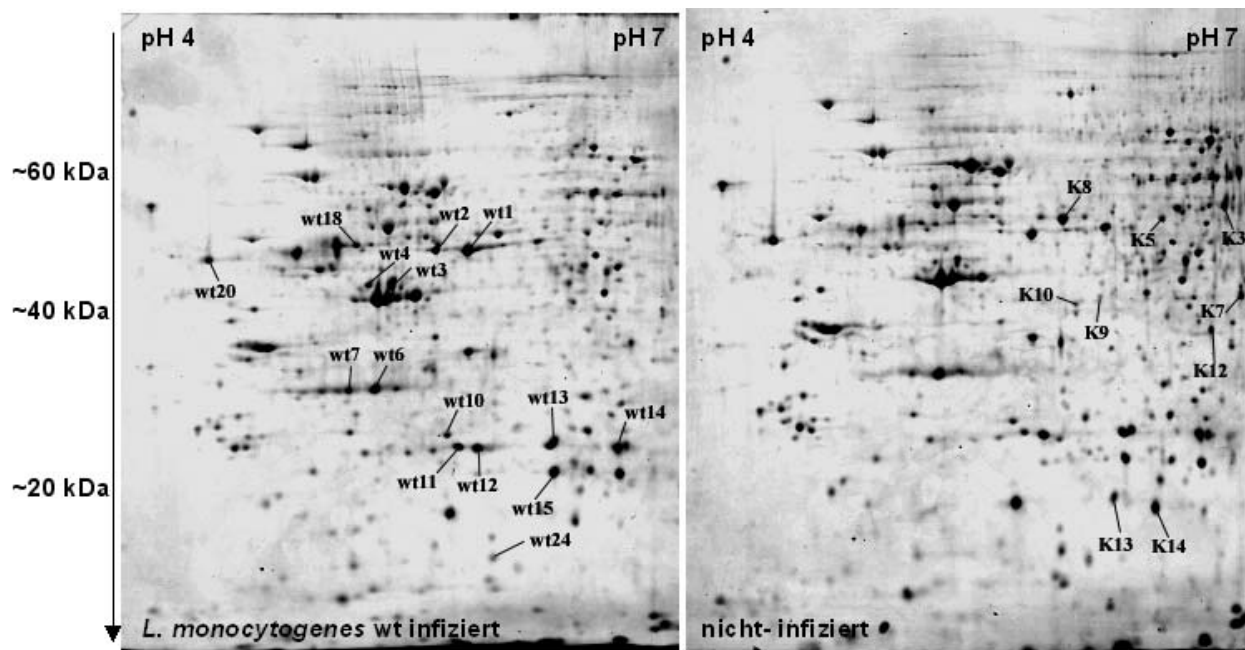


Abb. 3.9: ProQ-gefärbte 2D-Gele im Bereich von pH 4-7 von Proteinextrakten aus HeLa-Zellen nach 6stündiger Infektion mit *L. monocytogenes* wt (links) und nicht-infizierten Kontrollzellen (rechts).

Durch MALDI-TOF MS identifizierte Proteine sind markiert. Unterschiede im äußeren basischen Bereich (bei ~pH 7) sind vermutlich auf Fokussierungsartefakte zurückzuführen.

Die Analyse der Gele mit dem Programm Proteomweaver 2.0 ergab 18 regulierte Proteine, die meisten waren jedoch nur schwach reguliert (Tabelle 3.9). Zusätzlich wurden zur Überprüfung der Spezifität von ProQ mehrere scheinbar hochphosphorylierte Proteinspezies analysiert. Insgesamt wurden aus den ProQ-Diamond gefärbten Gelen 24 Proteine mittels MALDI-TOF MS identifiziert.

Die stärkste Regulation zeigte ein Spot bei ca. 50 kDa, der als Keratin 8 identifiziert werden konnte (Abb. 3.10). Keratin 8 gehört zu den Typ II Intermediärfilamentproteinen, über deren genaue Funktion wenig bekannt ist. Für Keratin 8 sind drei Phosphorylierungsstellen (Ser23, Ser73 und Ser431) bekannt. Die Modifikation von Ser23 ist bei allen Typ II Keratinen bekannt, während eine Phosphorylierung von Ser431 nur bei Keratin 8 nach EGF-Stimulation und während der Mitose über MAP-Kinasen beschrieben wurde (Ku and Omary, 1997). Phosphorylierung an Ser73 erfolgt während Mitose, Stress und Apoptose (Liao *et al.*, 1997) durch die c-Jun N-terminal kinase (JNK) (He *et al.*, 2002) bzw. die p38-MAP-Kinase (Ku *et al.*, 2002).

Tabelle 3.9: Aus ProQ-gefärbten 2D-Gelen identifizierte Proteine (*L. monocytogenes* wt-infizierte HeLa-Zellen vs. nicht infiziert).

Spot-Nr.	Protein (Funktion/Ähnlichkeit)	bekannte Phosphoryl.	Acc. Nr.	Regulation
wt1	Keratin 8 (~53 kDa)	ja (Liao <i>et al.</i> , 1996)	gi 4504919	+1,7
wt2	Keratin 8(~53 kDa)	ja (Liao <i>et al.</i> , 1996)	gi 4504919	+10
wt3	Keratin 8 (~45 kDa)	ja (Liao <i>et al.</i> , 1996)	gi 14198278	+2,5
wt4	Keratin 8 (~45 kDa)	ja (Liao <i>et al.</i> , 1996)	gi 14198278	+1,7
wt6	Splicing Factor, Arginine/Serine-rich 1	ja (Huang <i>et al.</i> , 2004)	gi 5902076	V
wt7	Keratin 9	ja (Ikai and McGuire, 1983)	gi 434576	V
wt10	Prohibitin	ja (Takahashi <i>et al.</i> , 2003)	gi 4505773	V
wt11	NADH-Dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S-Protein	nein	gi 4758788	+1,8
wt12	Thioredoxin Peroxidase	ja (Wood <i>et al.</i> , 2003)	gi 5453549	V
wt13	Splicing Factor, Arginine/Serine-rich 12	nein	gi 21040255	+1,4
wt14	Peroxiredoxin 6	ja (Wood <i>et al.</i> , 2003)	gi 4758638	V
wt15	Peroxiredoxin 3	ja (Wood <i>et al.</i> , 2003)	gi 32483377	+1,4
wt18	Tubulin, beta	ja (Otsubo <i>et al.</i> , 1975)	gi 21746161	+1,4
wt20	Calreticulin precursor	ja, (Cala <i>et al.</i> , 1993)	gi 4757900	-1,6
wt24	dUTP pyrophosphatase	ja (Lirette and Carradona, 1990)	gi 4503423	-1,4
k3	Glucose-6-Phosphate dehydrogenase	nein	gi 26224790	-3
k5	Chaperonin containing TCP1, subunit 2	nein	gi 5453603	V
k7	Tu translation elongation factor	ja (Cool <i>et al.</i> , 1990)	gi 2136315	A (-6)
k8	Keratin 7	ja (Ikai and McGuire, 1983)	gi 30089956	+1,7
k9	Capping Protein (actin filament) gelsolin-like	ja (Onoda and Yin, 1993)	gi 4502561	-1,5
k10	Maspin	ja (Odero-Marah <i>et al.</i> , 2002)	gi 4505789	-2,1
k12	Annexin 1	ja (Pepinsky and Sinclair, 1986)	gi 442631	A (-2)
k13	GrpE-like proteine cochaperone	nein	gi 11139093	-1,8
k14	Splicing factor, Arginine/Serine-rich 3	nein	gi 4506901	-1,4

V: Proteine wurden zur Validierung der Spezifität von ProQ analysiert

A: Regulation vermutlich auf Fokussierungsartefakte zurückzuführen und werden nicht weiter diskutiert

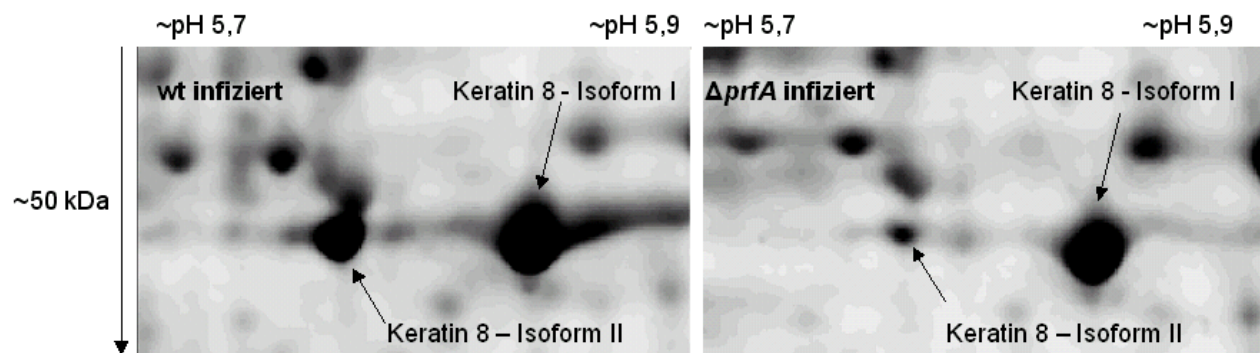


Abb. 3.10: In von *L. monocytogenes* wt infizierten HeLa-Zellen wird Isoform II von Keratin 8 um den Faktor 10 stärker phosphoryliert als in den mit *L. monocytogenes* $\Delta prfA$ -infizierten Kontrollzellen. Für Isoform I wurde ein Regulationswert von +1,7 bestimmt.

Des weiteren lagen noch zwei Proteine über der Regulationsgrenze von ± 2 : die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (-3) und der Proteaseinhibitor Maspin (-2,1).

Die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase ist ein Enzym des Pentose-Phosphatzyklus. Es wandelt Glucose-6-Phosphat in 6-Phosphoglucono-Lacton um und produziert dabei NADPH aus NADP^+ . Die Reprimierung der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase könnte damit erklärt werden, dass intrazelluläre Listerien zur Energiegewinnung phosphorylierte Hexosen der Wirtszelle gebrauchen. Hierzu benutzen sie den spezifischen, PrfA-abhängigen Hexose-Phosphat-Transporter Hpt (Chico-Calero *et al.*, 2002). Die Glucose-Phosphat-Konzentration könnte dadurch im Wirtscytosol soweit sinken, dass die Expression von Enzymen, die dieses Substrat umsetzen, von der Wirtszelle herunterreguliert werden.

Das Onkogen Maspin, das 2fach reprimiert gefunden wurde, gehört strukturell zu der Familie der Proteaseinhibitoren und inhibiert die Migration und Invasivität von Tumorzellen. Eine tatsächliche Aktivität als Proteaseinhibitor konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden (Bass *et al.*, 2002).

Für einige weitere Proteine, die im basischen Endbereich der Gelstreifen aufgelöst wurden, ergab sich ein starke Regulation, die aber wahrscheinlich auf Fokussierungseffekte zurückzuführen ist. Unter diesen Proteinen befanden sich EF-Tu mit einer Regulation von -6 und Annexin mit einer Regulation von -2. Diese beiden Proteine werden daher nicht weiter diskutiert.

Western Blots

Die Expression von Stathmin war bei den Versuchen des radioaktiven Labellings als stark reprimiert aufgefallen. Es ist bekannt, dass Stathmin mehrere posttranslationale Modifikationen (PTM) enthält (Muller *et al.*, 1999), weshalb die Reprimierung eines Spots im 2D-Gel auch auf PTM und damit Änderungen im Laufverhalten in der IEF bzw. der SDS-PAGE zurückzuführen sein könnten. Um alle Stathmin-Isoformen zu detektieren, wurden Proteine nach Auftrennung über 2D-Gelelektrophorese mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern gegen Stathmin behandelt. Sowohl der freundlicherweise von André Sobel (INSERM, Paris) zur Verfügung gestellte Antikörper als auch ein kommerziell erhältlicher Antikörper der Firma Cell Signaling waren nicht spezifisch, und beide erkannten z.T. bis zu 40 verschiedene Proteinspezies in 2D-Western Blots von HeLa-Zellen. Ein Antikörper der Firma Sigma zeigte ein in Masse und pI-Werten stimmiges Spotmuster.

Für die 2D-Western Blot-Versuche wurden 6×10^6 HeLa-Zellen wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben für 6 h mit *Listeria monocytogenes* infiziert. Die infizierten Zellen und Kontrollzellen wurden anschließend gewaschen, abgeschabt, zentrifugiert und mit Phosphatasehemmern-enthaltenden Lysepuffer aufgeschlossen. Die Proteinextrakte wurden mittels Phenol gefällt und über 2D-GE aufgetrennt. Ausschnitte der 2D-Gele in den Massenbereichen 10-60 kDa wurden mittels semi-dry Blot auf PVDF-Membranen übertragen und Stathmin durch den spezifischen Antikörper von Sigma nachgewiesen.

Das 17 kDa Protein Stathmin erscheint durch die bis zu vier Phosphorylierungen in mehreren Proteinisoformen, die unterschiedliche pI-Werte (ca. pH 5 - pH 6) und überraschend starke unterschiedliche Laufeigenschaften in SDS-Gelen (19-23 kDa) besitzen (Muller *et al.*, 1999; Daub *et al.*, 2001). Dadurch entsteht in 2D-Gelen ein komplexes Muster an Spots.

Abbildung 3.11 zeigt Western Blots von Stathmin aus infizierten und nicht-infizierten HeLa-Zellen. Es ist eine deutliche Verschiebung des Phosphorylierungsmusters von Stathmin in den infizierten Zellen zu erkennen. Durch Vergleich mit Berichten vom Laufverhalten der verschiedenen phosphorylierten Isoformen (Muller *et al.*, 1999; Daub *et al.*, 2001) sind die entsprechenden Spots als eine zweifach-phosphorylierte Isoform (P2) und die dreifach-phosphorylierte Isoform (P3; P-Ser16,25,38) identifiziert worden (siehe auch Kapitel 4.2.3). Da nach Daub *et al.* alle zweifach-phosphorylierten Stathminspezies in diesem Spot zusammenlaufen, kann aber nicht auf einfachem Weg festgestellt werden, welche zweifach-phosphorylierten Formen nun in den infizierten Zellen vermehrt vorliegen.

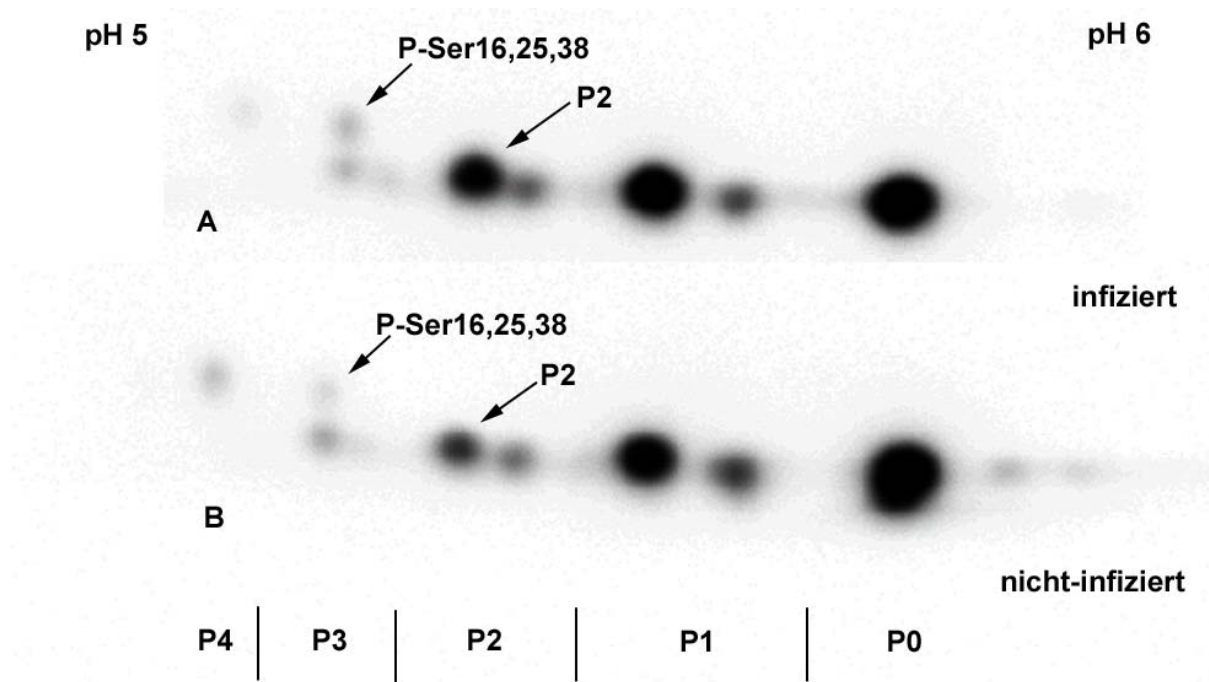


Abb. 3.11: 2D-Western Blots von Stathmin aus HeLa-Zellen nach 6 h Infektion mit *L. monocytogenes* wt (A) und nicht-infizierten Kontrollzellen (B).

Die vermutliche Spezies P-Ser16,25,38 (linker Pfeil) und die vermutlich doppelt-phosphorylierte Spezies P2 (rechter Pfeil) sind nach listerieller Infektion induziert. P0, P1, P2, P3 und P4 stehen für die entsprechenden Phosphorylierungsstufen von Stathmin.

Für Stathmin wurden mehrere Funktionen propagiert. Es ist durch unterschiedliche Phosphorylierungsmuster nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren (Daub *et al.*, 2001) aufgefallen und schon früh als wahrscheinliches Relais in der Signaltransduktion (Sobel, 1991) bezeichnet worden. Bekannteste Funktion ist jedoch die Mikrotubuli-destabilisierende Wirkung von Stathmin (Belmont and Mitchison, 1996). Während der Mitose wird Stathmin an unterschiedlichen Serinen phosphoryliert und am Ende des Zellzyklus wieder dephosphoryliert (vergleiche Kapitel 1.4.2). Weiterhin wurde gezeigt, dass Ser16 des Stathmin nach EGF-Stimulation über den Rac/CDC42-Signalweg und die p65PAK-Kinase phosphoryliert wird (Daub *et al.*, 2001). Neuere Untersuchungen machen den Rac1-Signalweg und die PAK1-Kinase hierfür verantwortlich (Wittmann *et al.*, 2004).

Eine zunehmende Phosphorylierung von Stathmin nach listerieller Infektion kann also auf eintretende Mitose bzw. auf eine Stimulation hinweisen, wie sie sonst durch Wachstumsfaktoren vermittelt wird.

3.5.3 Untersuchung der Expressionsunterschiede nach listerieller Infektion mittels Transkriptommethoden

Um komplementäre Daten zu den Proteomuntersuchungen der Wirtszellantwort auf listerielle Infektion zu erhalten, wurde auch eine Transkriptomuntersuchung mittels Affymetrix-Microarrays durchgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen internen Projekten, in denen ebenfalls Transkriptionsanalysen durchgeführt werden sollten, wurde das Infektionsprotokoll leicht abgeändert. Die MOI wurde gesenkt und nach einer Invasionszeit von 1,5 Stunden wurden die extrazellulären Listerien mit Gentamycin getötet, um einen definierten Stimulus zu erhalten.

Schalen mit 6×10^6 HeLa-Zellen wurden mit *Listeria monocytogenes* EGD-e wt mit einer MOI von 25 infiziert. Nach 1,5 Stunden wurden extrazelluläre Bakterien durch Waschen mit PBS und Zugabe von Gentamycin (5 µg/ml) entfernt. Mit einer Kontrollschale nicht-infizierter Zellen wurde gleich verfahren.

Nach 6stündiger Infektion wurden die Zellen abermals gewaschen und anschließend mit TriFast lysiert. Die RNA wurde von Tanja Töpfer in der Array-Facility der GBF aufgereinigt und mittels Affymetrix-Chips analysiert. Der hierfür verwendete GeneArray (HG_U 133A) enthält Sonden für 22215 verschiedene Transkripte des menschlichen Genoms. Abbildung 3.12 zeigt den sogenannten Scatter-Blot der Transkripte von *L. monocytogenes* wt-infizierten vs. nicht-infizierten HeLa-Zellen. Der Scatter-Blot zeigt die Mehrzahl der detektierten Transkripte (rot und blau) auf der Nullpunktlinie und nur relativ wenige induzierte Gene, was auf eine spezifische Antwort schließen läßt.

Tabelle 3.10 zeigt alle 46 induzierten und reprimierten Gene in den Bereichen $>+2$ und <-2 der differentiellen Genexpression von *L. monocytogenes* wt-infizierten HeLa-Zellen im Vergleich mit nicht-infizierten HeLa-Zellen. Für 3 der 46 Transkripte waren die entsprechenden Sonden doppelt auf dem Chip vorhanden und ihre Induktionen zeigten eine hohe Konsistenz. Ihre Expressionsänderungen wurden gemittelt.

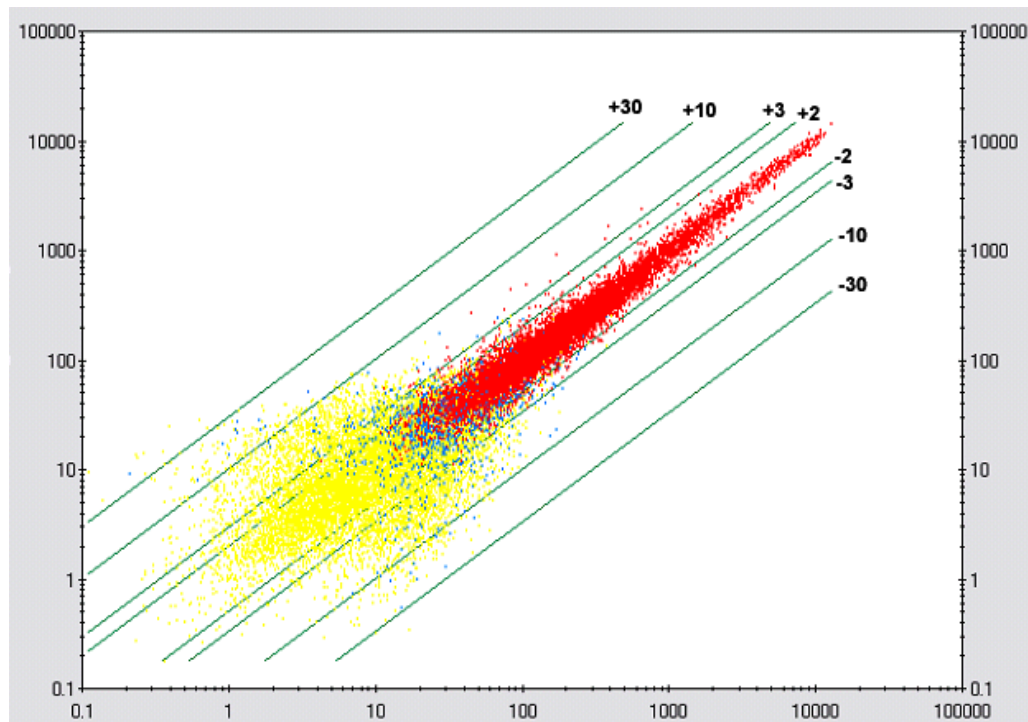


Abb. 3.12: Scatter-Blot der normalisierten Signalintensitäten der Microarray-Hybridisierungen. Abgebildet sind Einzelvergleiche von Hybridisierungen der Transkripte von *L. monocytogenes* wt-infizierten (y-Achse) und nicht-infizierten HeLa-Zellen (x-Achse). Die Punkte zeigen die jeweilige Signalintensitäten (x-/y-Achsen), die Stärke der Regulation (Linien im Graphen) und die Detektion (Farbcodes) einzelner Transkripte an. Farbcodes der Detektion bedeuten: Rot: Present-Present, Blau: Present-Absent bzw. Present-Marginal, Gelb: Absent-Absent bzw. Absent-Marginal

Durch listerielle Infektion induzierte Gene

Die höchste Induktion nach listerieller Infektion zeigte mit +6 der Kernrezeptor NR4A1 (auch Growth factor inducible nuclear protein N10, TR3 oder NUR77). NR4A1 ist an Apoptose, Zellproliferation und an der Zellantwort auf Wachstumsfaktoren beteiligt. Nach apoptotischen Stimuli wird er an die Mitochondrien dirigiert, wo er die Freisetzung von Cytochrom C und Apoptose induziert (Li *et al.*, 2000). Des weiteren zeigten Lin *et al.*, dass es mit BCL2 interagiert und eine Konformationsänderung in BCL2 bewirkt, die schließlich zur Apoptose führen kann (Lin *et al.*, 2004).

Die Dual-Specificity Phosphatase DUSP5 (auch: HVH3), die in *L. monocytogenes* infizierten Zellen um den Faktor +5 hochreguliert war, interagiert mit der ERK1-Kinase. Es wird vermutet, dass DUSP5, ähnlich wie andere Dual-Specificity Phosphatasen DUSP1 und DUSP2, bei einer Induktion zu einer Deaktivierung der Mitogen- oder Stress-aktivierten Proteinkinasen führt und dabei diese Signalwege in ihren Mitogen- bzw. Stress-sensitiven Zustand zurückführt (Ishibashi *et al.*, 1994).

Tabelle 3.10: Differentielle Genexpression von *L. monocytogenes* wt infizierten HeLa-Zellen im Vergleich mit nicht-infizierten HeLa-Zellen mit einer Regulation von ≥ 2

Regulation	Gen-Name	Funktion/Homologie	Acc. Nr.
6	NR4A1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	NM_002135.1
6	DUSP5	Dual specificity phosphatase 5	U16996.1
4	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	NM_000963.1
4	MAFF	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F	AL021977
3	CTGF	Connective tissue growth factor	M92934.1
3*	CYR61	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	NM_001554.1
3	FOSL1	FOS-like antigen 1	BG251266
3	IER3	Immediate early response 3	NM_003897.1
3	ZFP36	Zinc finger protein 36, C3H type, homolog	NM_003407.1
2	TNFAIP3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	NM_006290.1
2	FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	BC004490.1
2	PHLDA1	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	AA576961
2	PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	U08839.1
2	---	---	AL136139
2	EGR1	Early growth response 1	NM_001964.1
2*	BHLHB2	Basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	NM_003670.1
2	---	Homo sapiens cDNA: FLJ22182 fis, clone HRC00953	AA156240
-2	LIMD1	LIM domains containing 1	NM_014240.1
-2	PPIB	Peptidylprolyl isomerase B	NM_000942.1
-2	ARPC4	Actin related protein 2/3 complex, subunit 4, 20kDa	BE891920
-2	KNSL1	Kinesin-like 1	NM_004523.2
-2	CNOT3	CCR4-NOT transcription complex, subunit 3	NM_014516.1
-2	RAB1B	RAB1B, member RAS oncogene family	NM_030981.1
-2	MAZ	MYC-associated zinc finger protein	NM_002383.1
-2	FOLR1	Folate receptor 1	AF000381.1
-2	SRD5A1	Steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1	AF113128.1
-2	MGC2655	Hypothetical protein MGC2655	NM_024339.1
-2	HSPB7	Heat shock 27kDa protein family, member 7	NM_014424.1
-2	SF3A2	Splicing factor 3a, subunit 2, 66kDa	L21990
-2	ADAM15	A disintegrin and metalloproteinase domain 15	AK000667.1
-2	SSBP3	Single stranded DNA binding protein 3	NM_018070.1
-2	AGRN	Agrin	AK021586.1
-2	CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	NM_004364.1
-2	LRP16	LRP16 protein	NM_014067.2
-2	CACNB2	Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit	NM_000724.1
-3	FLJ10656	Hypothetical protein FLJ10656	NM_018170.1
-3	LOC51157	LDL induced EC protein	NM_016202.1
-3	PLD3	Likely ortholog of mouse phospholipase D3	NM_012268.1
-3	FKBP8	FK506 binding protein 8, 38kDa	L37033
-3	TMPO	Thymopoietin	AF113682.1
-3	EHD2	EH-domain containing 2	NM_014601.1
-3	BTBD2	BTB (POZ) domain containing 2	NM_017797.1
-4*	TXNIP	Thioredoxin interacting protein	NM_006472.1

*: Transkript war mehrfach auf dem Chip vorhanden. Die Regulationsdaten wurden gemittelt.

Die Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase PTGS2 (auch COX2) war um den Faktor +4 hochreguliert und wurde in mehreren Zusammenhängen beschrieben. So ist sie u.a. ein Regulationspunkt für die Synthese von Prostaglandinen. Tsujii *et al.* zeigten, dass eine höhere Expression von PTGS2 zu einer besseren Adhäsion an die extrazelluläre Matrix und einer Inhibition der Apoptose via BCL2 führt (Tsujii *et al.*,

1998). Des weiteren ist bekannt, dass PTGS2 in entzündetem Gewebe überexprimiert wird (Samad *et al.*, 2001).

MAF, was 4fach hochreguliert wurde, kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit einer Masse von 17,8 kDa. Wie andere kleine MAF-Proteine, enthält es eine ausgedehnte Leucin-Zipper-Struktur. Die MAF-Proteine besitzen eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Onkogenen FOS, JUN und MYC (Nishizawa *et al.*, 1989), die alle mit „Cell-Survival“ (dem Überleben der Zelle), Proliferation und Apoptose in Verbindung gebracht werden (Levens, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Eferl *et al.*, 2003).

Der „Connective Tissue Growth Factor“ CTGF, der 3fach hochreguliert war, gehört zu der Gruppe der sogenannten „immediate-early Genen“, welche nach Induktion mit Wachstumsfaktoren und bestimmten Onkogenen exprimiert werden (Kim *et al.*, 1997).

CYR61 („Cysteine-Rich, Angiogenic Inducer 61“) war 3fach hochreguliert. Die OMIM-Datenbank beschreibt Cyr61 als ein sekretiertes, Cystein-reiches, Heparin-bindendes Protein, dessen Gen auch zu den sogenannten „immediate-early Genen“ gehört. Es ist ein extrazelluläres, Matrix-assoziiertes Signalmolekül, das sowohl die Adhäsion durch Interaktion mit Integrin als auch die DNA-Synthese nach Wachstumsfaktor-Induktion in Endothelzellen erhöht (OMIM-ID: 602369).

Unter den übrigen zwischen +3-+2-fach hochregulierten Genen befinden sich FOS und das „FOS-like Antigen“ FOSL1, das die Funktion des „Early-Response-Regulators“ FOS ersetzen kann (Matsuo *et al.*, 2000). Für den Transkriptionsfaktor FOS wird eine Rolle in Signaltransduktion, Zellproliferation und Differentiation vermutet (Wang *et al.*, 1992). Es wurde gezeigt, dass FOS in neuronalen Zellen verantwortlich ist für Signale, die das Überleben der Zelle sichern (Zhang *et al.*, 2002). Auffallend sind auch das „Immediate-Early Response Gen“ IER3, das zur NF κ B-Familie gehört und Zellen vor FAS- und TNF-induzierter Apoptose rettet (Wu *et al.*, 1998), sowie TNFAIP3, das „Tumor Necrosis Factor-Alpha-inducible Protein 3“, das die NF κ B-Induktion reduziert und TNF-induzierte Apoptose inhibiert (Lee *et al.*, 2000). Das „Early-Growth-Response Gen“ EGR1, das eine FOS-ähnliche Induktionskinetik nach Mitogenstimulation in Fibroblasten, Epithelzellen und Lymphozyten besitzt (OMIM Datenbank: 128990), ist ebenfalls induziert.

Durch listerielle Infektion reprimierte Gene

Die am stärksten reprimierten Gene waren mit dem Faktor -4 TXNIP, das für ein Protein kodiert, welches Thioredoxin, den wichtigsten Regulator des Redoxzustandes der Zelle, inhibiert (Bodnar *et al.*, 2002) und BTBD2 (-3), für das nur eine Interaktion mit der Topoisomerase I bekannt ist (Xu *et al.*, 2003).

Unter den übrigen zwischen -3-(-2)fach reprimierten Genen findet man FKBP8, das für ein BCL2- und BCLXL-interagierendes Protein kodiert. Für FKBP8 wurde spekuliert, dass es durch Bindung der BCL-Proteine in der mitochondrialen Membran Apoptose inhibiert (Shirane and Nakayama, 2003). Außerdem sind RAB35, ein Mitglied der Ras-Familie der kleinen GTPasen und ARPC4, die zentrale Untereinheit 4 des Arp2/3-Komplexes (Robinson *et al.*, 2001), 2fach reprimiert.

3.6 Charakterisierung der Wirtszellantwort auf Präsentation von Internalin B

In den vorherigen Kapiteln wurde die Untersuchung der Wirtszellantwort auf eine listerielle Infektion beschrieben (vergleiche Kapitel 3.5.1 & 3.5.2). Bei den Untersuchungen wurde eine zusätzliche Phosphorylierung des Proteins Stathmin über 2D-Western Blots festgestellt. Für die Phosphorylierung von Stathmin wurden mehrere Kinasen beschrieben (siehe Kapitel 1.4.2), darunter Kinasen des Rac/Cdc42-Signalweges (Daub *et al.*, 2001).

Um die Komplexität des Stimulus auf die Wirtszellen in weiteren Experimenten einzuschränken, wurden HeLa-Zellen in späteren Versuchen nur ein listerielles Oberflächenprotein präsentiert. Hierfür wurde das am besten charakterisierte listerielle Protein InIB ausgewählt, u.a. weil beschrieben worden war, dass es den Rac/Cdc42-Signalweg aktivieren kann (Bierne *et al.*, 2001).

InIB interagiert mit dem Human Growth Factor-Rezeptor Met (siehe Kapitel 1.4.1). Durch vergleichende Präsentation von InIB und HGF sollten Unterschiede zwischen dem Signalling der beiden Proteine herausgearbeitet und anhand der Phosphorylierungsänderungen von Stathmin untersucht werden.

HeLa-Zellen wurden in 10 cm-Schalen angezogen und bei 70%iger Konfluenz wurde ihnen für 24 h das Serum entzogen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und ihnen für 30 min in Serum-freiem Medium entweder 1,5 nM humanes HGF (Sigma) oder 1,5 nM InIB₃₂₁ präsentiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, abgeschabt, zentrifugiert und mit Lysepuffer in der Gegenwart von Phosphatasehemmern aufgeschlossen. Die Proteinextrakte wurden mittels Phenol gefällt und über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Ausschnitte der 2D-Gele in den Massenbereichen 10-60 kDa wurden mittels semi-dry Elektroblot auf PVDF-Membranen übertragen und Stathmin durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Nach 30minütiger Inkubation mit HGF und InIB₃₂₁ traten in 2D-Western Blots drei spezifische phosphorylierte Stathmin-Isoformen auf, die in den unbehandelten Kontrollzellen nicht auftraten (Abb. 3.13). Durch Vergleich mit Berichten vom Laufverhalten der verschiedenen phosphorylierten Isoformen (siehe Kapitel 4.2.3) (Muller *et al.*, 1999; Daub *et al.*, 2001) kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass eine Isoform die 3fach-phosphorylierte Spezies

Stathmin-(P-Ser16, P-Ser25, P-Ser38) darstellt (Abb. 3.13, schwarzer Pfeil), die anderen die 3fach-phosphorylierte Spezies Stathmin-(P-Ser25, P-Ser38, P-Ser64) (Abb. 3.13, roter Pfeil) und eine 2fach-phosphorylierte Spezies P2 (Abb. 3.13, grüner Pfeil).

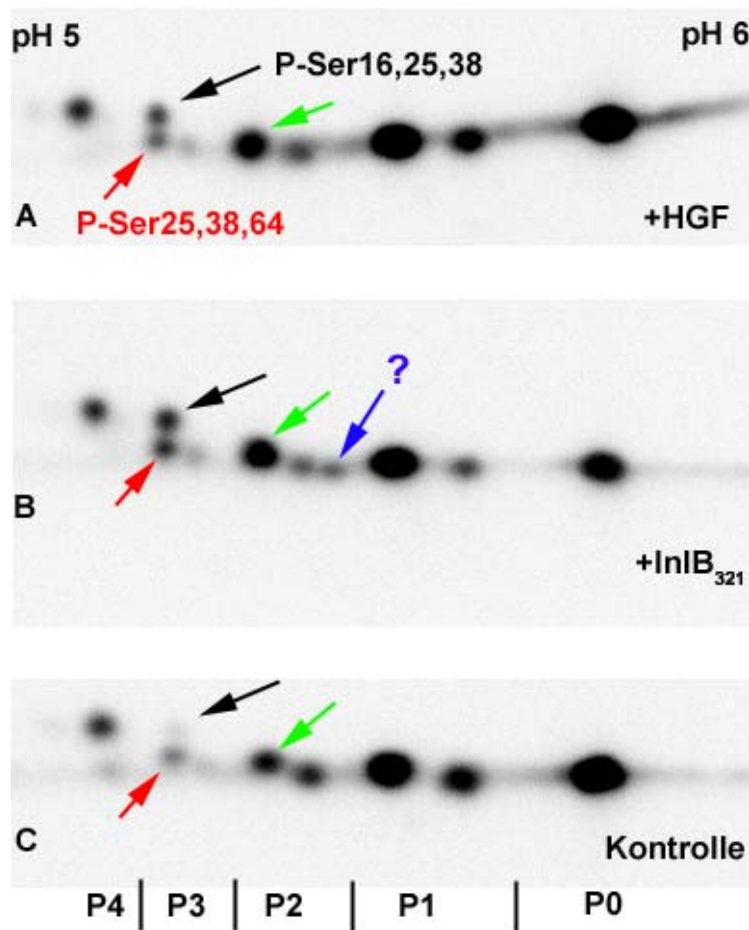


Abb. 3.13: 2D-Western Blots von Stathmin aus HeLa-Zellen nach 30 min Inkubation mit 1,5 nM HGF (A), 1,5 nM InIB₃₂₁ (B) und Kontrolle (C).

Die vermutliche Spezies P-Ser16,25,38 (schwarzer Pfeil), die vermutliche Spezies P-Ser25,38,64 (roter Pfeil) und die zweifach-phosphorylierte Spezies P2 (grüner Pfeil) sind nach HGF- und InIB-Inkubation induziert. Zudem ist nach InIB-Behandlung eine weitere spezifische Stathmin-Spezies zu beobachten (blauer Pfeil).

3.7 Untersuchung der Kolokalisierung intrazellulärer *Listeria* mit der Focal Adhesion Kinase

Während der Untersuchung der allgemeinen Wirtszellantwort auf listerielle Infektion war das Phosphoprotein Stathmin, das in der Wirtszelle eine Reihe von Funktionen inne hat, durch Änderungen seines Phosphorylierungsgrades aufgefallen. Für Stathmin war aber auch eine (wenn auch indirekte) Interaktion mit einem listeriellen Protein beschrieben worden: Pfeuffer *et al.* beschrieben, dass das Wirtszellprotein LaXp180 mit dem listeriellen Oberflächenprotein ActA interagiert (Pfeuffer *et al.*, 2000). Für LaXp180 wiederum war eine mögliche Interaktion mit Stathmin gezeigt worden (Maucuer *et al.*, 1995). Durch Kolokalisationsexperimente zeigten Pfeuffer *et al.*, dass ActA an dem Bakterienpol, der nicht Aktin polymerisiert, sowohl mit LaXp180 als auch mit Stathmin kolokalisiert (Pfeuffer *et al.*, 2000).

Für die Aminosäuresequenz von LaXp180 gibt es mehrere Einträge in der NCBI-Datenbank. So wurde das Protein u.a. auch noch als Transkriptionsfaktor RB1CC1 (Chano *et al.*, 2002a) beschrieben und als ein Inhibitor der Focal Adhesion Kinase (FAK) (Abbi *et al.*, 2002).

Die Interaktion von listeriellen ActA mit FAK könnte eine weitere Verbindung von Listerien zum Aktin-Zytoskelett und zum intrazellulären Signalling darstellen. Daher wurden Kolokalisierungsstudien mit wt *Listeria monocytogenes* und einer *actA*-Deletionsmutante in Zellen, die ein GFP-FAK-Fusionsprotein exprimieren, durchgeführt. Dieses Konstrukt wurde freundlicherweise von C. Hauck (Zentrum für Infektionsforschung, Würzburg) zur Verfügung gestellt.

HeLa-Zellen wurden mit einem Plasmid, das die Gensequenz des Fusionsproteins GFP-FAK enthält, transfiziert. Nach 20 Stunden konnte die erfolgreiche Transfektion der Zellen durch grüne Fluoreszenz der fokalen Adhäsionsregionen beobachtet werden. Die Zellen wurden mit *L. monocytogenes* wt oder mit der listeriellen *actA*-Deletionsmutante für 1,5 Stunden infiziert, anschließend wurde mit PBS gewaschen und neues Medium mit Gentamycin (5 µg/ml) zugegeben, um extrazelluläre Listerien abzutöten. Nach weiteren 3,5 Stunden Inkubation wurden die Zellen fixiert und Aktin mittels eines Phalloidin-Alexa568-Konjugates angefärbt. Abbildung 3.14 zeigt eine Immunfluoreszenzaufnahme einer mit GFP-FAK-transfizierten und mit *L. monocytogenes* infizierten Zelle.

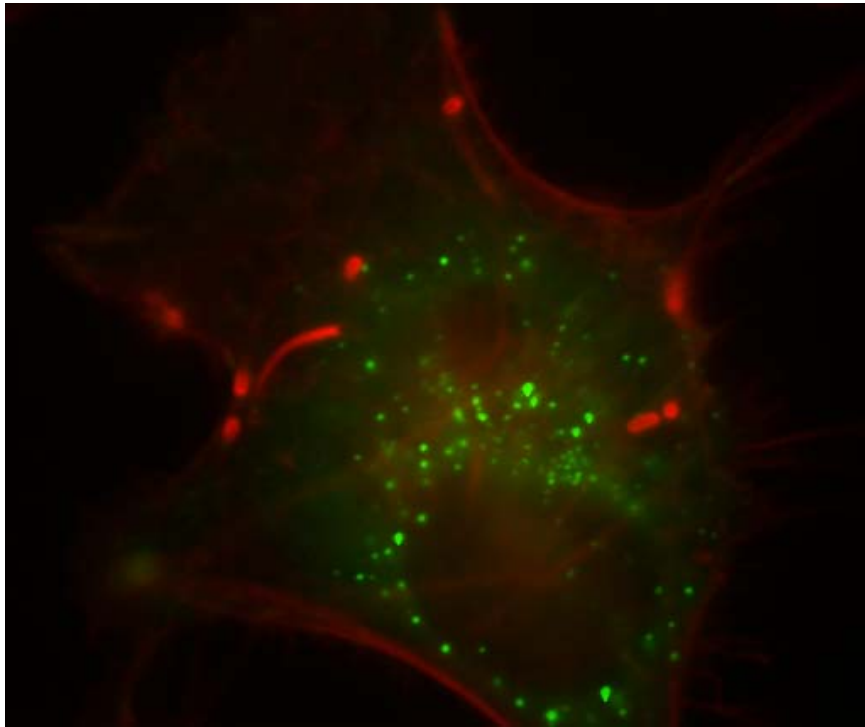


Abb. 3.14: Immunfluoreszenzmikroskopieaufnahme von mit *L. monocytogenes* wt infizierten HeLa-Zellen.

Die HeLa-Zellen sind mit GFP-FAK transfiziert (grün), F-Aktin ist durch ein Alexa568-Phalloidin-Konjugat rot angefärbt. Die Listerien, die an ihren typischen 'Aktinschwänzen' zu erkennen sind, bzw. von Aktin umgeben sind, kolokalisieren nicht mit den Fokalen Kontakten bzw. FAK.

Es wurden mehrere infizierte Zellen mittels Immunfluoreszenz analysiert. In keinem Fall konnte eine Kolokalisierung von intrazellulären Listerien und der Focal Adhesion Kinase beobachtet werden. Eine Interaktion von ActA über LaXp180 mit FAK ist daher unwahrscheinlich.

4. DISKUSSION

4.1 Charakterisierung sekretorischer und Zellwand-gebundener Proteine von *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes ist ein fakultativ intrazelluläres humanes Pathogen, das ein Modellorganismus für die Untersuchung anderer Gram-positiver Bakterien darstellt. *L. monocytogenes* besitzt die besondere Fähigkeit, extreme Umweltbedingungen zu überstehen und kann durch einen außergewöhnlichen Infektionszyklus dem humoralen Wirtsimmunsystem entkommen. Auch wenn listerielle Infektionen selten sind, stellen sie durch ihre hohe Mortalität eine Gefahr für den Menschen dar.

Die Oberflächen-gebundenen und sekretorischen Proteine von Bakterien erfüllen eine Reihe von Funktionen für das Überleben des Organismus in ihrer spezifischen Umwelt. Diese Proteine sind an der Zellwanderingerung, der Nahrungsaufnahme, der Zellkommunikation, der Entgiftung und dem Töten von konkurrierenden Mikroorganismen in der jeweiligen ökologischen Nische beteiligt. Pathogene Bakterien müssen zusätzlich ein ganzes Arsenal an weiteren Faktoren für die Adhäsion, Invasion, Proliferation und das Überleben im eukaryontischen Wirt besitzen. Die Analyse der sekretorischen Proteine befähigt uns zu der Identifikation neuer möglicher Virulenzfaktoren, die für das Überleben des Pathogens während der Infektion des Wirtes notwendig sind.

4.1.1 Untersuchung von kovalent-gebundenen Zellwandproteinen von *L. monocytogenes*

Eine Untergruppe der Oberflächen-gebundenen Proteinen von Gram-positiven Bakterien bilden die sogenannten LPXTG-Proteine. Diese werden über einen spezifischen Mechanismus durch das Enzym Sortase (SrtA) an die Diaminopimelinreste der bakteriellen Zellwand kovalent gebunden (für Übersichtsartikel siehe: Paterson and Mitchell, 2004).

Viele der bisher identifizierten LPXTG-Proteine sind wichtige Virulenzfaktoren in *Streptococci*, *Staphylococci* und *Listeria* (für Übersichtsartikel siehe: Navarre and Schneewind, 1999). So ist für die LPXTG-Proteine Protein A (Sjoquist *et al.*, 1972; Sjo Dahl, 1977) sowie FnbA (Flock *et al.*, 1987) und FnbB (Jonsson *et al.*, 1991) von

Staphylococcus aureus eine Interaktion mit Wirtszellproteinen schon lange bekannt. Bei *Listeria monocytogenes*, das mehr LPXTG-Proteine als jedes andere bekannte Gram-positive Bakterium besitzt (vgl. Kapitel 1.3) (Glaser *et al.*, 2001), werden alle Mitglieder der Internalin-Familie außer InlB (GW-Module) und InlC (sekretiert) über LPXTG-Motive an die Zelloberfläche gebunden (Schubert *et al.*, 2001), darunter InlA, ein wichtiger Virulenzfaktor für die Invasion in eukaryontische Zellen (Gaillard *et al.*, 1991). Hinzu kommt, dass sich in der Gruppe der LPXTG-Proteine der größte Unterschied zwischen der pathogenen und apathogenen *Listeria*-Art zeigt: 11 der 41 LPXTG-Proteine von *Listeria monocytogenes* sind nicht in *Listeria innocua* vorhanden. Eine Beteiligung weiterer LPXTG-Proteine an der Pathogenität von *Listeria monocytogenes* ist daher wahrscheinlich.

Die Untersuchung dieser Proteingruppe stellte bisher eine große Herausforderung dar. Die LPXTG-Proteine, da an die Zellwand gebunden, sind nur schwer aufzutrennen und werden scheinbar nicht in sehr großen Mengen exprimiert. Selbst nach endolytischer Protoblastierung von Listerien durch ein Phagen-Lysozym und Mutanolysin konnten diese Proteine nicht im Überstand nachgewiesen werden (Schaumburg, 2004).

Um eine Beteiligung der Sortase A an der kovalenten Verknüpfung der LPXTG-Proteine an die Zellwand zu zeigen und zur allgemeinen Charakterisierung des Subproteoms der kovalent-gebundenen Zellwandproteine, wurden Zellwände von *L. monocytogenes* wt und einer Sortase A-Deletionsmutante ($\Delta srtA$) nach Zellaufschluß aufgereinigt, nicht-kovalente Proteine durch SDS entfernt und die verbleibenden, kovalent verküpften Proteine über MS/MS bzw. LC-MS/MS identifiziert.

Es konnten an den aufgereinigten Zellwänden 27 Proteine identifiziert werden (Tabelle 3.1). Sechs von den im wt identifizierten Proteinen enthielten ein LPXTG-Signal. Von diesen Proteinen wurde keines in der $\Delta srtA$ -Mutante identifiziert, das die Beteiligung der Sortase A an der kovalenten Bindung dieser Proteine an die Zellwand beweist (Bierne *et al.*, 2002b).

Vier weitere Zellwandproteine wurden identifiziert. Von diesen fielen besonders SvpA (Lmo2185) und Lmo2186 auf, beides strukturell ähnliche Proteine und hypothetische Fe³⁺-(NEAr)-Transporter (Andrade *et al.*, 2002). Da sie in allen Präparationen vorhanden waren, wurde schon früh eine kovalente Bindung an die Zellwand vermutet. Für SvpA konnte kürzlich auch gezeigt werden, dass es durch die Sortase

B, ein Homolog der Sortase A, über ein NXZTN-Signal an das Peptidoglycan gebunden wird (Bierne *et al.*, 2004).

Die anderen Proteine, die in beiden Stämmen identifiziert wurden, sind größtenteils stark hydrophobe cytosolische Proteine, die in großen Mengen vorkommen und deshalb vermutlich als Kontaminationen in den Präparationen vorhanden waren.

Von den sechs identifizierten LPXTG-Proteinen ist nur InlA näher charakterisiert worden (Gaillard *et al.*, 1991; Mengaud *et al.*, 1996). Lmo0130 besitzt eine 5'-Nukleotidase-Domäne, Lmo0514 eine Homologie zu der Internalin-Familie und Lmo1666 eine Cadherin/Hyalin-Domäne. Lmo2714 verfügt über keine bekannte Domänenstruktur und besitzt Lmo0880 eine Collagen-bindende Domäne (alle Domänenvorhersagen durch InterPro, EBI).

Die hier vorliegenden Ergebnisse stellen die erste erfolgreiche Untersuchung der schwer zu charakterisierenden LPXTG-Proteine mittels Proteommethode dar. Die identifizierten Proteine enthalten putative Domänen, die - wie die Collagen-bindende Domäne von Lmo0880 oder die Cadherin-Domäne von Lmo1666 - eine Beteiligung dieser Proteine an der Pathogenität von *L. monocytogenes* wahrscheinlich macht und ihre funktionelle Charakterisierung erfordert. Eine weitere Untersuchung mit neueren, sensitiveren Methoden wie Nano-LC-MS/MS wird vermutlich zu der Identifikation noch weiterer Mitglieder dieser Proteingruppe beitragen.

4.1.2 Untersuchung der sekretorischen Proteine von *L. monocytogenes*

Sekretorische Proteine pathogener Bakterien sind an vorderster Front hinsichtlich der Interaktion mit dem Wirt. Dementsprechend wurden in den letzten Jahren die Überstandspoteine von verschiedenen Pathogenen wie *Mycobacterium tuberculosis* (Jungblut *et al.*, 1999; Rosenkrands *et al.*, 2000), *Helicobacter pylori* (Bumann *et al.*, 2002), *Streptococcus pylori* (Lei *et al.*, 2000) und *Staphylococcus aureus* (Ziebandt *et al.*, 2001) untersucht. Die sekretorischen Proteine von *L. monocytogenes* waren bisher noch nicht erforscht worden, obwohl *L. monocytogenes* eines der am besten untersuchten Gram-positiven Pathogene ist, das der Nahrungsmittelindustrie erhebliche Probleme bereitet und einen Modellorganismus für andere Gram-positive pathogene Bakterien darstellt. Diese Arbeit präsentiert eine weitreichende Proteomuntersuchung dieser wichtigen Subfraktion von *L. monocytogenes*.

Bioinformatische Vorhersage

Durch eine bioinformatische Untersuchung des listeriellen Genoms konnte die Vorhersage der putativ sekretierten Proteine verbessert werden. Die bioinformatische Vorhersage, die nur so gut wie die experimentellen Daten sein kann, auf denen die Programme basieren, bietet eine Möglichkeit der Validierung für die experimentelle Untersuchung des Sekretoms. Die Einteilung der Proteine in Klassen, je nachdem, durch wie viele Programme eine Sekretion vorhergesagt wurde, schaffte eine Wahrscheinlichkeits-abhängige Verteilung der Proteine. Die meisten der Proteine erscheinen in den Klassen 7 - 5 und besitzen daher mit großer Sicherheit ein Sekretionssignal. In den Klassen 3 und 4, die bekannte Oberflächenproteine wie MurA (3) und InlB (4) enthielten, waren nur noch wenige putativ exportierte Proteine (vergleiche Tabelle 3.2) und es ist zu erwarten, dass in diesen Klassen auch Falschpositive vorhanden sein können. Durch das Einbeziehen der Transmembran-Domänen und der hypothetischen Funktionen der Proteine, konnte jedoch eine Liste an Proteinen erarbeitet werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit sekretiert werden.

Die ursprüngliche Liste des Europäischen *Listeria* Konsortiums (Glaser *et al.*, 2001), die durch das Programm SignalP erstellt worden war, sagte 86 Proteine vorher. Von diesen 86 Proteinen wurden 10 Proteine als entweder Oberflächen-gebunden oder

nicht sekretorisch identifiziert (Anhang, Tabelle 8.2). Durch den neuen Ansatz konnten 121 Proteine identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit sekretiert werden. Darunter sind 45 Proteine, für die bisher kein SP vorhergesagt wurde. Von diesen 45 Proteinen wurden 6 im Kulturüberstand mittels Proteommethode detektiert, darunter MurA, für das ein Sekretionssignal bereits experimentell bewiesen worden ist (Carroll *et al.*, 2003).

2D-Gelelektrophorese und LC-MS von sekretorischen Proteinen

Die beiden Proteommethoden 2D-GE und HPLC-MS/MS komplementieren sich in ihren Möglichkeiten. 2D-GE ist besonders für die Analyse posttranslationaler Modifikationen (PTM) und prozessierter Proteine geeignet. Auch lassen sich mit 2D-GE bis zu 10.000 Proteinspezies auftrennen (Klose, 1999) und diese mit Fluoreszenzfarbstoffen quantifizieren. Nur basische, stark hydrophobe, sehr kleine und sehr große Proteine können schlecht mit der 2D-GE untersucht werden. LC-MS/MS wiederum ist schnell, einfach und sensitiv und nicht abhängig von der Proteingröße, -basizität oder -hydrophobizität. Für komplexere Proben ist der Trennraum von LC-MS/MS jedoch zu gering. Ebenso schwierig sind die Analyse von PTM und die Quantifizierung. Zwar sind in den letzten Jahren mehrere Entwicklungen für die Quantifizierung mittels LC-MS präsentiert worden, aber keine der vorhandenen Techniken war für die Untersuchung des listeriellen Sekretoms anwendbar. ICAT (Gygi *et al.*, 1999) beispielsweise konnte nicht verwendet werden, da die sekretorischen Proteine von *Listeria* nur wenige Cysteine enthalten. Der Mass-coded abundance tag (MCAT) (Cagney and Emili, 2002) wiederum, bei dem in einer der beiden Probe alle Lysine zu Homoargininen derivatisiert werden, wodurch die Massen von Lysin-haltigen Peptiden um 42 Da verschoben werden, erwies sich in der Massenspektrometrie als sehr schwer zu interpretieren. Versuche mit Aminosäuren, die stabile Isotope enthalten, wie sie bei der Markierung mit stabilen Isotopen (SILAC) (Ong *et al.*, 2002) verwendet werden, sind für bakterielle Kulturen zu teuer. Deshalb wurde in unserem Labor eine neue Diskontinuierliche Expressionsanalyse (DEA) entwickelt, durch die eine Quantifizierung der Proteine über LC-MS/MS-Identifikation von Verdünnungsreihen der Proteingemische möglich ist.

Insgesamt konnten durch 2D-GE und LC-MS/MS 54 Proteine von *L. monocytogenes* mit einem vorhergesagten Sekretionssignal identifiziert werden. Die bioinformatische Analyse ergab 121 sekretierte Proteine. Es muß davon ausgegangen werden, dass unter den hier gewählten Kulturbedingungen immer nur ein Teil der Proteine exprimiert wird. Hinzu kommen die Proteine, die nur in geringen Mengen exprimiert werden und durch die gewählten Methoden nicht detektierbar sind. Es wurden jedoch alle bekannten primären Virulenzfaktoren (siehe Einleitung, Kapitel 1.1.1) mit einem Sekretionssignal identifiziert, was die Bedeutung dieses Subproteoms und die Verlässlichkeit des gewählten Ansatzes beweist.

Überraschend waren die großen Mengen Zellwand- bzw. Membran-gebundener Virulenzfaktoren im Kulturüberstand. Von diesen sind nur Hly, PlcA, PlcB, Mpl und InlC 'rein sekretorische' Proteine, d.h. sie besitzen kein Retentionssignal und erfüllen ihre Aufgaben im extrazellulären Milieu. InlA, InlB und ActA sollten jedoch über ein LPXTG-Motiv, ein GW-Modul bzw. einen hydrophoben Anker an die Zelloberfläche gebunden werden. Die Anwesenheit dieser Faktoren im Überstand könnte durch die Freisetzung nach Zellwandumbau oder durch zusätzliche Funktionen im Sekretom erklärt werden. Für InlA, das über ein LPXTG-Motiv kovalent an die Zellwand gebunden wird, und für den Aktinnukleator ActA wurden bisher keine Funktionen für die freigesetzte Formen beschrieben. Für freigesetztes InlB ist berichtet worden, dass es über die GW-Module an den Wirtszellrezeptor gC1q-R bindet und dadurch eine Met-gestützte Phagozytose unterstützt (Marino *et al.*, 2002). Auch die Bindung von InlB an Met wird durch die GW-Module, die das Protein sonst in der Zellwand verankern, verstärkt (Banerjee *et al.*, 2004).

Insgesamt wurden 6 von 9 im Genom vorhergesagten Proteinen mit GW-Modulen im Kulturüberstand identifiziert. Offenbar ist diese Proteinfamilie durch die Interaktion ihrer GW-Domänen mit der Lipoteichonsäure an der Zelloberfläche nur schwach gebunden und wird zu einem großen Teil in das Medium freigesetzt. Die kontinuierliche Freisetzung dieser Proteine könnte ein ausgeklügelter Mechanismus für die kontrollierte Abgabe von Effektorproteinen sein.

Zusätzlich zu den primären Virulenzfaktoren wurden weitere Proteine identifiziert, für die ein Einfluß auf die Pathogenität von *Listeria* beschrieben wurde: LpeA (Lmo1847) wurde als Invasin vorgeschlagen (Reglier-Poupet *et al.*, 2003b), OppA (Lmo2196), ein Teil eines Oligopeptid-bindenden Proteins, hat einen Einfluß auf intrazelluläres Überleben der Listerien (Borezee *et al.*, 2000) und Auto (Lmo1076) besitzt eine

autolytische Aktivität, die für eine effektive Infektion notwendig ist (Cabanés *et al.*, 2004).

Außer den bekannten Proteinen wurde auch eine große Gruppe mit 17 Proteinen unbekannter Funktion im Kulturüberstand identifiziert. Von diesen besitzen 7 kein vorhergesagtes Sekretionssignal, darunter LmaA (Antigen A, Lmo0118), ein Protein, das eine spezifische Hypersensitivitätsantwort in Mäusen auslöst, die gegen *Listeria* immun sind. Für LmaA wurde eine extrazelluläre Lokalisation bereits gezeigt (Gohmann *et al.*, 1990).

Überraschenderweise konnten viele kleine Proteine im Kulturüberstand identifiziert werden, obwohl diese üblicherweise durch die geringe Anzahl an tryptischen Fragmenten schwerer durch massenspektrometrische Verfahren zu detektieren sind. 30 der gefundenen Überstandsproteine von *Listeria monocytogenes* sind <20 kDa. Diese kleinen Proteine sind von Interesse, da sie über spezifische Sekretionswege wie den kürzlich für Gram-positive Bakterien beschriebenen ESAT-6-Sekretionsweg (Gey Van Pittius *et al.*, 2001; Pallen, 2002) in das Medium gelangen könnten.

Insgesamt besitzen 51 der identifizierten Proteine des Sekretoms kein Sekretionssignal. Bei der Untersuchung anderer Überstandsproteome wie beispielsweise die von *B. subtilis* (Antelmann *et al.*, 2001) oder *H. pylori* (Jungblut *et al.*, 1999) waren ähnliche Mengen an Proteinen mit vorhergesagter cytosolischer Lokalisation identifiziert worden. Um festzustellen, welche der cytosolischen Proteine aufgrund von Zelllyse in den Überstand gelangt sein könnten, wurde eine Proteomanalyse des Gesamtzelllysates von *L. monocytogenes* durchgeführt und die 25 häufigsten Proteine bestimmt (Anhang, Abb. 8.3), wozu auch Enolase, EF-Tu, GroEL und DnaK gehörten. Lenz *et al.* zeigten jedoch, dass Enolase, EF-Tu, GroEL und DnaK sowie Oberflächenproteine wie OppA und Ami spezifisch durch den SecA2-Sekretionsweg (Lmo0583) (Lenz and Portnoy, 2002) exportiert werden können (Lenz *et al.*, 2003) und dieser dadurch einen Einfluß auf die listerielle Virulenz ausübt. Das listerielle *secA2*-Gen besitzt eine putative PrfA-Bindestelle und wurde bereits als Bestandteil der listeriellen Membran identifiziert (Elmar Fischer, GBF, Braunschweig, persönliche Mitteilung). Wie SecA2 diese Proteine ohne Signalsequenz exportiert, ist unbekannt.

Auch die Superoxid-Dismutase (Sod), die keine Signalsequenz besitzt, wird über SecA2 exportiert, wie kürzlich für *M. tuberculosis* beschrieben wurde (Braunstein *et al.*, 2003). Es wurde vermutet, dass Sod die Bakterien gegen die oxidative Attacke

von Makrophagen schützt (Braunstein *et al.*, 2003). Für *L. monocytogenes*, das bei der Phagozytose kurzfristig im Phagolysosom einer oxidativen Umgebung ausgesetzt ist, wäre ein ähnlicher Mechanismus denkbar.

Für mehrere cytosolische Proteine wird eine weitere Funktion im extrazellulären Milieu diskutiert ('Moonlighting Proteins') (Jeffery, 1999; Jeffery, 2003). So ist beispielsweise Enolase mehrerer pathogener Mikroorganismen in der Lage, humanes Plasminogen zu binden (Pancholi and Fischetti, 1998; Bergmann *et al.*, 2001; Jong *et al.*, 2003; Sha *et al.*, 2003), das eine Rolle bei der Adhäsion an Wirtszellen spielen könnte. Signal für den Export der Enolase ist möglicherweise eine kovalente Modifikation durch ihr Substrat 2-Phospho-Glycerat, wie kürzlich für die Enolase aus *E. coli* gezeigt wurde (Boel *et al.*, 2004).

Ein sehr überraschendes Ergebnis war die Detektion von 5 hypothetischen Sensoren und Transkriptionsregulatoren im Kulturüberstand von *L. monocytogenes* wt, wobei ein weiterer Regulator (Lmo0790) im Medium der $\Delta prfA$ -Mutante identifiziert werden konnte. Von diesen Regulatoren besitzen drei ein Sekretionssignal (Lmo0443, Lmo1061, Lmo2518). Transkriptionsregulatoren an der Zelloberfläche sind wichtig für die Signaltransduktion und die Zellantwort. Sie reagieren auf unterschiedlichste Umwelteinflüsse und sind wichtige Elemente in der Interaktion mit dem Wirt (Kreikemeyer *et al.*, 2003). Auch die gefundenen Regulatoren könnten von Wichtigkeit für die listerielle Virulenz sein. So besitzt Lmo0443, ein hypothetischer LytR-Regulator, Ähnlichkeiten zu dem Regulator MsrR (alle Homologievergleiche durch Blast und das Programm InterPro, European Bioinformatic Institute; Apweiler *et al.*, 2000; Mulder *et al.*, 2003). MsrR beeinflusst die zelluläre Antwort auf Zellwand-aktive Antibiotika und die Expression von Virulenzfaktoren in *Staphylococcus aureus* (Rossi *et al.*, 2003). Lmo2518 besitzt ebenfalls eine LytR-Domäne, während Lmo1061 die höchste Homologie zu einer Sensor-Histidin-Kinase aus *B. anthracis* aufweist. Lmo2795 besitzt Ähnlichkeiten zu dem Transkriptionsregulator RpiR von *E. coli*, der an der Steuerung des Ribosemetabolismus beteiligt ist (Sorensen and Hove-Jensen, 1996), und Lmo0526 besitzt Homologien zu einem Transkriptionsaktivator von sogenannten Multidrug-Efflux-Transporter-Genen in *B. halodurans*. Damit stellen die identifizierten Regulatoren eine weitere Gruppe an Proteinen, die für die listerielle Pathogenität wichtig sein könnte.

Identifikation PrfA-regulierter Gene

Die Produkte PrfA-abhängiger Gene sind für die Pathogenität von *L. monocytogenes* von besonderer Bedeutung. Der Unterschied zwischen dem wt und der *prfA*-Deletionsmutante ist auf dem Protein-Level in Gesamtzellextrakten bemerkenswert gering, wie in 2D-Gelen gezeigt werden konnte (Anhang, Abb. 8.3 & 8.4). Am augenscheinlichsten wird der Unterschied im Subproteom der Zellwand-gebundenen Proteine (Daten nicht gezeigt) und im Kulturüberstand, der in dieser Arbeit untersucht wurde.

Es konnte eine positive PrfA-Regulation für alle primären Virulenzfaktoren gezeigt werden, was die Verlässlichkeit der Daten beweist. Auch Internalin C (InlC), für das eine Beteiligung an der listeriellen Infektion in Mausexperimenten gezeigt werden konnte (Domann *et al.*, 1997) und für das es in der apathogenen Art *L. innocua* kein Ortholog gibt, wird durch PrfA stark hochreguliert (Abb. 3.3).

Es konnten zusätzlich für weitere Proteine im Kulturüberstand PrfA-abhängige Expressionsunterschiede bestimmt werden (Tab. 3.5). Die Anwesenheit eines Proteins im extrazellulären Milieu nach Deletion eines Transkriptionsregulators hängt jedoch nicht nur direkt von der Expression ab. Auch indirekt kann die Deletion durch Repression oder Modulation spezifischer Transporter, Signalpeptidasen oder Proteasen Einfluß auf die Anwesenheit im Überstand nehmen. Hinzu kommt, dass sich nach Deletion eines Gens die Proteinzusammensetzung im Sekretom auch durch Kompensationseffekte ändern kann. Daher kann nicht unterschieden werden, ob die unterschiedlichen Mengen PrfA-regulierter Proteine im Überstand aufgrund von Expressionsänderungen oder unterschiedliche Translokation zustande kamen.

Die durch PrfA-hochregulierten Überstandsproteine haben einen Einfluß auf Zellwandauf- und -abbau, Substrattransport, Peptidasen- und Proteasenaktivität, transkriptionelle Regulation und Sensing. Diese Funktionen sind alle von besonderer Wichtigkeit für pathogene Bakterien und die erfolgreiche Infektion des Wirtes und die PrfA-Abhängigkeit zeichnet diese Proteine als potentielle neue Virulenzfaktoren aus.

Die höchsten positiven Regulationen wurden nach den bekannten Virulenzfaktoren für ein putatives Adhäsion (Lmo0153), für Lmo1715, ein Protein unbekannter Funktion, für das Penicillin-bindende Protein Lmo2754, für die GW-Module enthaltende, putative Muramidase Lmo2591, für MurA und für OppA identifiziert. Alle

diese Proteine besitzen vorhergesagte Sekretionssignale, aber nur Lmo2591 besitzt eine potentielle PrfA-Bindestelle. Es ist nicht bekannt, ob die anderen Proteine direkt oder indirekt durch PrfA reguliert werden. Erste Analysen der listeriellen Membranfraktionen weisen jedoch darauf hin, dass SecA2 positiv PrfA-abhängig ist (Elmar Fischer, persönliche Mitteilung) und mindestens eines der hochregulierten Proteine (OppA) wird durch SecA2 transloziert (Lenz *et al.*, 2003).

Nur zwei Proteine (FbaA und Ctc) sind in geringerer Menge im Kulturüberstand des wt - verglichen mit dem Überstand der $\Delta prfA$ -Mutante - vorhanden. Für die entsprechenden Gene wurde zwar bisher keine PrfA-Abhängigkeit beschrieben, es konnte jedoch kürzlich durch Transkriptionsanalyse eine σ^B -Abhängigkeit gezeigt werden (Kazmierczak *et al.*, 2003). Weiterhin ist beschrieben worden, dass das PrfA- und das σ^B -Regulon eng mit einander verbunden sein könnten. So zeigten Sokolovic *et al.*, dass die Expression der primären Virulenzfaktoren durch Stress wie Hunger, hohe Zelldichte und Hitzeschock ansteigt (Sokolovic *et al.*, 1993). Nadon *et al.* zeigten, dass einer der beiden Promotoren des *prfA*-Gens σ^B -abhängig ist (Nadon *et al.*, 2002). Auch für die Internaline A-E wurde kürzlich eine σ^B -abhängige Expression beschrieben (Kazmierczak *et al.*, 2003), womit die detektierte Expression der Internaline in der $\Delta prfA$ -Mutante erklärt werden könnte.

Für die Teilgruppe der primären Virulenzfaktoren stimmen die in dieser Arbeit gezeigten Daten mit den veröffentlichten Transkriptionsdaten (Michel *et al.*, 1998; Milohanic *et al.*, 2003) überein. Die Daten des Proteom- und des Transkriptionsansatzes unterscheiden sich jedoch für alle anderen Gene. Mögliche Gründe hierfür sind die unterschiedlichen Kulturbedingungen (BHI bzw. Minimalmedium) und die unterschiedlichen Wachstumsphasen, in denen die Zellen geerntet wurden. Ebenso könnte die indirekte Regulation der sekretorischen Proteine über den Transport eine Rolle spielen.

Identifikation *Listeria monocytogenes*-spezifischer Proteine

Listeria monocytogenes und *Listeria innocua* sind zwei nah verwandte Arten (88 % Homologie), die sich in ihren Lebensstilen deutlich unterscheiden können. Während *L. innocua* ein apathogenes Bodenbakterium ist, kann *L. monocytogenes* in Menschen wie Tieren lebensbedrohliche Krankheiten auslösen. Die Verfügbarkeit dieser zwei verwandten Arten, die sich in der Pathogenität unterscheiden, bewirkte die Genomsequenzierung beider Organismen durch das Europäische *Listeria* Konsortium (Glaser *et al.*, 2001), die bemerkenswerte Unterschiede zwischen den Arten aufdeckte. Die hier gezeigte Analyse komplementiert nun diese Arbeit für das Subproteom der Kulturüberstände.

Der zuerst durchgeführte Vergleich der Gesamtzellextrakte von *L. monocytogenes* und *L. innocua* offenbarte eine bemerkenswerte Ähnlichkeit der beiden Spezies (Anhang, Abb. 8.3 & 8.5). Die Verschiedenheit der beiden Arten manifestiert sich am stärksten in den Oberflächen- und Kulturüberstandsproteomen.

Beide *Listeria*-Arten translozierten ungefähr die gleiche Anzahl und die gleiche Menge an Protein in das extrazelluläre Milieu. Für beide Spezies konnten ungefähr je 100 Proteine identifiziert werden, wobei rund die Hälfte dieser Proteine von beiden sekretiert wurden. Die andere Hälfte war jeweils spezifisch für die pathogene und die apathogene Art. 16 Proteine, deren orthologen Gene in *L. innocua* nicht vorhanden sind, wurden im Überstand von *L. monocytogenes* identifiziert. Diese Proteine sind von großem Interesse, da alle primären Virulenzfaktoren Teil dieser Gruppe sind. Für einige weitere Proteine dieser Gruppe wie Internalin H (Raffelsbauer *et al.*, 1998) oder Auto (Lmo1076) (Cabanès *et al.*, 2004) wurde bereits ein möglicher Einfluß auf die Pathogenität von *Listeria* beschrieben.

Ebenso in dieser Gruppe sind Proteine wie Lmo1666, ein 184 kDa großes Oberflächenprotein, das eine putative Cadherin-Domäne besitzt. Dieses Protein ist besonders interessant, da die Adhäsion von Pathogenen an die Wirtszellen einer der wichtigsten Schritte zu Beginn einer Infektion ist. Das Teichonsäure-Biosynthese Protein GgaB könnte ebenfalls an der Virulenz beteiligt sein, da Teichonsäure mit InlB interagiert (Jonquieres *et al.*, 1999) und bei der Adhäsion von *Staphylococcus epidermis* an Wirtszellen von Bedeutung ist (Hussain *et al.*, 2001). Die Sensor-Histidin-Kinase Lmo1061 ist besonders hervorzuheben, da es der einzige Zwei-Komponenten-Sensor ohne Ortholog in *L. innocua* ist (Glaser *et al.*, 2001). Für

mehrere andere bakterielle Zwei-Komponenten-Histidin-Kinasen wurde bereits eine Beteiligung an der Pathogenität gezeigt (Throup *et al.*, 2000; Autret *et al.*, 2003). Außerdem wurden zwei kleine Proteine (Lmo1125 und Lmo2410) ohne Ortholog in *L. innocua* gefunden, die keine Ähnlichkeit zu bekannten Protein besitzen.

Der Vergleich der Kulturüberstände von *L. monocytogenes* und *L. innocua* zeigte in der Gruppe der Zellwand-gebundenen und sekretorischen Proteine einen großen Unterschied. 20 dieser Proteine (einschließlich Virulenzfaktoren) von *L. monocytogenes* konnten nicht in *L. innocua* identifiziert werden, während für *L. innocua* 8 Proteine dieser Gruppe spezifisch waren. Andererseits exprimierte *L. innocua* unter den experimentellen Bedingungen wesentlich mehr Proteine von Phosphotransferase-Systemen (PTS), obwohl das Genom von *L. monocytogenes* für deutlich mehr PTS-Proteine kodiert (Glaser *et al.*, 2001). Ähnliches gilt für die Flagellenproteine, die bei *L. innocua*, aber nicht bei *L. monocytogenes* identifiziert wurden. Flagellenproteine werden in *L. monocytogenes* nur bei niedrigeren Temperaturen (<25°C) exprimiert (Peel *et al.*, 1988).

L. monocytogenes sekretierte mehr Proteine für die Adaption an die Umgebung als *L. innocua*. Hierzu gehören u.a. die hypothetische Sulfatase/Phosphatase Lmo0644 und das putative Kälteschockprotein Lmo2016. Mit Proteinen aus dieser Gruppe kann sich *L. monocytogenes* vermutlich schneller auf wechselnde Umweltbedingungen einstellen.

Spezifisch für das *L. monocytogenes* Sekretom waren auch die Proteine der Pur-Familie. Die Rolle dieser eigentlich cytosolischen Proteine des Nukleotidmetabolismus im Kulturüberstand ist von Interesse, da bereits beschrieben wurde, dass in intrazellulären Listerien die Expression von PurH und PurD erhöht wird (Klarsfeld *et al.*, 1994).

Interessanterweise wurden 7 Proteine des Kohlenhydratmetabolismus spezifisch im Überstand von *L. innocua* gefunden. Solche in großen Mengen im Cytosol vorkommenden glykolytischen Proteine wie Enolase (Bergmann *et al.*, 2001; Bergmann *et al.*, 2003; Schaumburg *et al.*, *im Druck*) oder Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (Pancholi and Fischetti, 1992; Modun and Williams, 1999), aber auch Stressproteine wie GroEL (Maguire *et al.*, 2002) sind als sogenannte 'schwarzarbeitende' Proteine (moonlighting proteins) beschrieben worden (Jeffery, 1999; Jeffery, 2003). Für diese Proteine wurde aufgrund ihrer Bindung zu Plasmin und Plasminogen ein Einfluß auf die Pathogenität diskutiert. In dieser Arbeit konnte

jedoch keinerlei Spezifität für die Anwesenheit dieser Proteine für die pathogene Spezies detektiert werden. Zwar könnten diese Proteine durch Zelllyse in das Medium und an die Zelloberfläche gelangen, andere Arbeiten zeigten jedoch, dass beispielsweise SecA2 an der Sekretion von Proteinen wie GroEL, DnaK, EF-Tu oder Enolase beteiligt sein könnte (Lenz *et al.*, 2003). Auch die Beobachtung, dass Enolase aus *E. coli* sekretiert wird, wenn sie durch ihr Substrat modifiziert wurde (Boel *et al.*, 2004), spricht für eine spezifische Sekretion. Mit Sicherheit wird in den nächsten Jahren die Diskussion, ob die Anwesenheit der cytosolischen Proteine im Überstand von biologischer Bedeutung ist, weitergeführt werden.

Die Vielzahl der Proteine, die ohne klassisches Sekretionssignal außerhalb der Zelle gefunden wurde, erfordert, die Suche nach weiteren, bisher unbekannten Sekretionswegen voranzutreiben.

4.2 Charakterisierung der Wirtszellantwort auf Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Das Bakterium *L. monocytogenes* gehört zu den am besten charakterisierten Gram-positiven Pathogenen. Viele bakterielle Faktoren, die dem Bakterium ein Überleben in den unterschiedlichen Nischen ermöglichen, und die T-Zellimmunität sind gut untersucht. Über die unmittelbare Wirtszellantwort auf listerielle Invasion und Infektion, die bisher nur mittels Transkriptomics (Cohen *et al.*, 2000; Baldwin *et al.*, 2003) untersucht wurde, ist jedoch wenig bekannt.

4.2.1 Einfluß der experimentellen Bedingungen auf die Analyse der Wirtszellantwort

Ziel der Proteomuntersuchungen von infizierten eukaryontischen Zellen war es, sowohl einen umfassenden Überblick über Veränderungen in der Wirtszelle auf dem Proteinlevel zu erhalten als auch interessante Proteine für weitere Untersuchungen zu identifizieren. Als analytisches System wurde die 2D-Gelelektrophorese gewählt, da durch sie eine große Zahl an Proteinen aufzutrennen und dadurch ein guter Überblick zu erhalten ist. Für die Beurteilung der Veränderungen im Wirtszellproteom ist die Qualität der 2D-Gele von entscheidender Bedeutung. Auf die Qualität der 2D-Gele hatten mehrere Parameter Einfluss, die im folgenden diskutiert werden:

Die Lyse der Zellen in Quellslösung, die anschließend direkt für die IEF verwendet wurde, war nur für kleine Zellmengen ($<10^6$ Zellen) wie bei der ^{35}S -Autoradiographie praktikabel. Der Aufschluß größerer Zellzahlen (z.B. aus Ø10 cm Petrischalen) in Quellslösung führte zu einer schlechten Fokussierung, vermutlich aufgrund der großen Mengen an Salzen und DNA aus den lysierten Zellen. Daher wurden bei größeren Zellmengen die Proteine mit 1% Igepal oder Triton X-100 extrahiert. Diese beiden Detergenzien lassen bei dieser Konzentration die Zellkernmembran intakt, wodurch DNA mit den Zellkernen durch Zentrifugation entfernt werden kann. Die Extraktion führte jedoch zu einer Verschlechterung der Reproduzierbarkeit, da immer nur ein Teil des Gesamtproteins extrahiert werden kann.

Aus den Extrakten liessen sich die Proteine durch Fällung aufreinigen, wobei die Phenolfällung der TCA-Fällung vorgezogen wurde, da sie zu deutlich weniger

Streifenbildung während der IEF führte. Bei der Benutzung von Phosphatase-inhibierendem NaF konnte ohnehin nur mit Phenol gefällt werden, da sonst flüchtiges HF entstanden wäre.

Ebenso führte die Benutzung einer modifizierten Quelllösung (Hoving *et al.*, 2002), die 10% Isopropanol und 5% Glycerin enthielt, zu einer Verbesserung der Fokussierung. Grund hierfür war vermutlich eine Verringerung des Elektroendoosmotischen Flusses, eines aktiven Wassertransportes während der IEF, der zu schlechten Fokussierungsergebnissen im Randbereich der Gelstreifen und damit zu Streifen im 2D-Gel führen kann (Hoving *et al.*, 2002).

In den Versuchen dieser Arbeit wurden die Zellen für je 6 Stunden mit *L. monocytogenes* infiziert. Dieser Zeitraum wurde gewählt, da in Transkriptsversuchen eine starke Induktion von Genen nach 2-4 Stunden Infektion mit *L. monocytogenes* festgestellt worden war (Cohen *et al.*, 2000; Baldwin *et al.*, 2003). Apoptose, Nekrose oder Lyse der Zellen war zu diesem Zeitpunkt durch mikroskopische Überprüfung nicht zu erkennen. Der gewählte Zeitraum für die Infektionsdauer stellt jedoch nur ein spezifisches Proteom der Wirtszellantwort dar. Möglicherweise wäre durch Zellernte an anderen Zeitpunkten ein größerer Unterschied auf der Proteinebene zu erkennen gewesen. So könnten Änderungen auf der Ebene der posttranslationalen Modifikationen sehr viel schneller (innerhalb der ersten 30 min) und Änderungen auf dem Expressionslevel in einem späteren Zeitrahmen stattfinden.

In ersten Experimenten wurde die Infektion durch *L. monocytogenes* wt mit der Infektion durch eine $\Delta actA$ - bzw. eine $\Delta prfA$ -Mutante verglichen. Hierzu wurde eine MOI von 50 verwendet. Dies ist ein relativ hoher Wert, der aber zu einer Infektionsrate von ca. 80% aller Zellen durch *L. monocytogenes* wt führte. Auf dem Proteomlevel bedeutet das, dass eine Überexpression eines Proteins von 4 auf den 2D-Gelen einer Überexpression von 5 in den infizierten Zellen entsprach.

Die Infektionsrate der $\Delta actA$ -Mutante, die nicht fähig ist, sich in der Wirtszelle fortzubewegen und über Sekundärinfektionen Nachbarzellen zu infizieren, betrug nur ca. 25%. Dies macht eine Identifizierung regulierter Proteine sehr schwer, weshalb auf weitere Versuche mit der $\Delta actA$ -Mutante verzichtet wurde.

Um den spezifischen Unterschied zwischen Stressantwort auf extrazelluläre Bakterien und Antwort auf Invasion zu identifizieren, wurden zusätzliche Infektionsexperimente mit der $\Delta prfA$ -Mutante als Kontrolle durchgeführt. Wie durch

Immunfluoreszenzexperimente bestätigt werden konnte, adhärirten die Bakterien des *prfA*-Deletionsstammes zwar an die Zellen, drangen aber aufgrund der geringen Expression der Virulenzfaktoren nicht ein (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde ihre extrazelluläre Lokalisation dadurch bewiesen, dass sie durch Zugabe von Gentamycin abgetötet wurden. Dies befindet sich im Widerspruch zu Baldwin *et al.*, die beschrieben, dass eine *prfA*-Deletionsmutante zur Invasion in Caco2-Zellen befähigt sei (Baldwin *et al.*, 2003).

Die verwendeten Proteinextraktionen bzw. das Gesamtzelllysate der eukaryontischen Zellen, wurden benutzt, um einen möglichst breiten Überblick über die Änderungen im Wirtszellproteom zu erhalten. Die Analyse so komplexer Proben ist in der 2D-GE jedoch noch immer problematisch, da die Gesamtmenge an Protein, die auf ein Gel aufgetragen werden kann, begrenzt ist und sie sich hauptsächlich auf hoch-exprimierte Proteine verteilt, die zum größten Teil selbst nicht Teil von Signaltransduktionsketten sind. Signaltransduktion wird in der Regel durch niedrig-exprimierte Proteine realisiert, die durch die in großen Mengen vorhandenen Proteine 'überdeckt' werden und aufgrund ihrer eigenen geringen Konzentration nicht durch Gelfärbung bzw. Massenspektrometrie nachgewiesen werden können. Eine Beschränkung auf eine Subfraktion wie es z.B. für die Plasmamembran (Foster *et al.*, 2003), die Mitochondrien (Mootha *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2003) oder Zellkerne (Schirmer *et al.*, 2003) gezeigt wurde, oder aber die Affinitätsreinigung von speziellen Proteinuntergruppen wie den Phosphoproteinen (Oda *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001) hätte wahrscheinlich weitere Unterschiede aufgedeckt.

4.2.2 HeLa-Zellen zeigen eine geringe Wirtszellantwort auf listerielle Invasion

Während der Untersuchungen der Wirtszellantwort auf listerielle Invasion wurden differentiell regulierte Proteine mit drei unterschiedlichen Methoden nachgewiesen: (i) Nachweis der neusynthetisierten Proteine durch ³⁵S-Autoradiographie, (ii) Nachweis durch Färbung des Gesamtproteoms durch RuBPS und (iii) Nachweis des Phosphoproteoms durch ProQ. Induzierte Gene wurden durch eine Transkriptionsanalyse identifiziert.

Die Ergebnisse der Proteomanalysen lassen den Schluß zu, dass infizierte HeLa-Zellen wenig auf translationaler Ebene während der ersten Stunden der Infektion reagieren. Es konnten weder besonders starke Änderungen der Neusynthese noch

des Abbaus von Wirtsproteinen identifiziert werden. Einige Änderungen konnten auf der Ebene der Phosphorylierungen erkannt werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass eukaryontische Zellen in erster Linie auf der posttranslationalen Ebene auf eine Invasion durch *L. monocytogenes* reagieren, vermutlich auch, weil dies die schnellste Möglichkeit zur Signaltransduktion darstellt.

Für die Untersuchung des Phosphoproteoms wurde der Fluoreszenzfarbstoff ProQ eingesetzt, der eine nicht-radioaktive Alternative zu ^{32}P bzw. ^{33}P -Autoradiogrammen darstellt. Die Spezifität dieses Farbstoffes wurde gezeigt, da für mindestens 18 der 24 identifizierten Proteine in der Literatur schon Phosphorylierungen beschrieben worden sind. Die Sensitivität von ProQ ist jedoch nur wenig höher als die von RuPBS, weshalb auch in ProQ-gefärbten Gelen von Gesamtzellextrakten, Proteine in niedriger Kopienzahl durch die in großer Menge vorliegenden phosphorylierten Strukturproteine überdeckt werden. Wie schon in Kapitel 4.2.1 beschrieben, müssten Subproteome bzw. biochemische Fraktionen der eukaryontischen Zellen generiert werden, um Signalproteine wie Kinasen identifizieren zu können.

Auch auf der Ebene der Transkription scheinen die Auswirkungen einer listeriellen Invasion gering wie erste Ergebnisse zeigten. Nur 43 Gene waren nach 6 Stunden mehr als 2fach induziert oder reprimiert. Dieses Ergebnis stimmt aber mit Beobachtungen anderer Transkriptionsanalysen infizierter Zelllinien überein (Cohen *et al.*, 2000, Baldwin *et al.*, 2002). Aber nicht nur die geringe Anzahl induzierter Gene, sondern auch die geringe Stärke der Induktionen überraschte. Cohen *et al.*, die THP1-Zellen für ihren Transkriptionsassay benutzten sahen z.T. Induktionen von über 100. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sie mit THP1 eine zum Immunsystem gehörende Monozytenzelllinie benutzten. Baldwin *et al.*, die mit Caco2 eine Epithelzelllinie verwendeten, berichteten nur von geringen Induktionen, die sich mit denen in dieser Arbeit gezeigten Daten vergleichen lassen.

Die geringe Wirtszellantwort in Epithelzellen lässt vermuten, dass es für *Listeria* möglich ist, die Wirtszellreaktion auf Invasion gering zu halten. Hierdurch wäre *Listeria monocytogenes* befähigt, Entzündungssignale zu minimieren und sich dadurch möglichst unbemerkt von den infizierten Zellen und vom Immunsystem auszubreiten.

4.2.3 Stathmin wird durch listerielle Invasion und Internalin B spezifisch phosphoryliert

Nachdem Stathmin bei den ersten Autoradiogrammen von infizierten Wirtszellen als stark reprimiert aufgefallen war, wurde dieses 17 kDa große Protein näher untersucht. Stathmin ist ein Phosphoprotein mit vier bekannten Phosphorylierungsstellen (Ser16, 25, 38, 63) und wurde als Relaisprotein der Signaltransduktion beschrieben (Sobel, 1991). Es besitzt eine Mikrotubuli-destabilisierende Aktivität, die durch Phosphorylierung inhibiert wird (Marklund *et al.*, 1996).

Pfeuffer *et al.* berichteten, dass intrazelluläre *Listeria monocytogenes* über ActA mit dem Wirtsprotein LaXp180 interagieren, das wiederum an Stathmin binden kann (Pfeuffer *et al.*, 2000). Das 180 kDa große LaXp180, dessen genaue Lokalisation in der Zelle unklar ist, wurde kurze Zeit später von anderen Gruppen als ein im Zellkern lokalisierter Transkriptionsfaktor RB1CC1 (Chano *et al.*, 2002a) bzw. als FIP200 beschrieben, das über mehrere Domänen an die Focal Adhesion Kinase (FAK) bindet und diese inhibiert (Abbi *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die FAK und intrazellulären Listerien nicht direkt interagieren. Für andere invasive Pathogene wie *Y. pseudotuberculosis* wurde eine Aktivierung der FAK, die an vielen wichtigen zellulären Prozessen beteiligt ist (Schlaepfer *et al.*, 1999), durch bakterielle Faktoren beschrieben (Alrutz and Isberg, 1998). Eine solche Aktivierung könnte auch für *Listeria monocytogenes* der Fall sein und durch eine Untersuchung der listeriellen Invasität in FAK^{-/-}-Zellen bzw. die Analyse des Phosphorylierungsstatus von FAK in invasierten Wirtszellen aufgeklärt werden.

Nach 6stündiger listerieller Infektion liegt Stathmin höher-phosphoryliert vor als in nicht-infizierten Zellen wie durch Western Blotting detektiert werden konnte (Abb. 3.10). Durch Vergleich mit publizierten Daten aus 2D-Gelen und 2D-Western Blots liessen sich die einzelnen Stathminisoformen gut identifizieren (Abb. 4.1). Induziert sind die zweifach-phosphorylierten Spezies, die sich nicht gelelektrophoretisch auflösen lassen und die dreifach-phosphorylierte Isoform P-Ser16, 25, 38, für die schon eine Induktion in Hep2-Zellen nach EGF-Stimulation gezeigt wurde (Daub *et*

al., 2001). Die Menge der Isoform P-Ser25, 38, 63 blieb in diesen Experimenten unverändert.

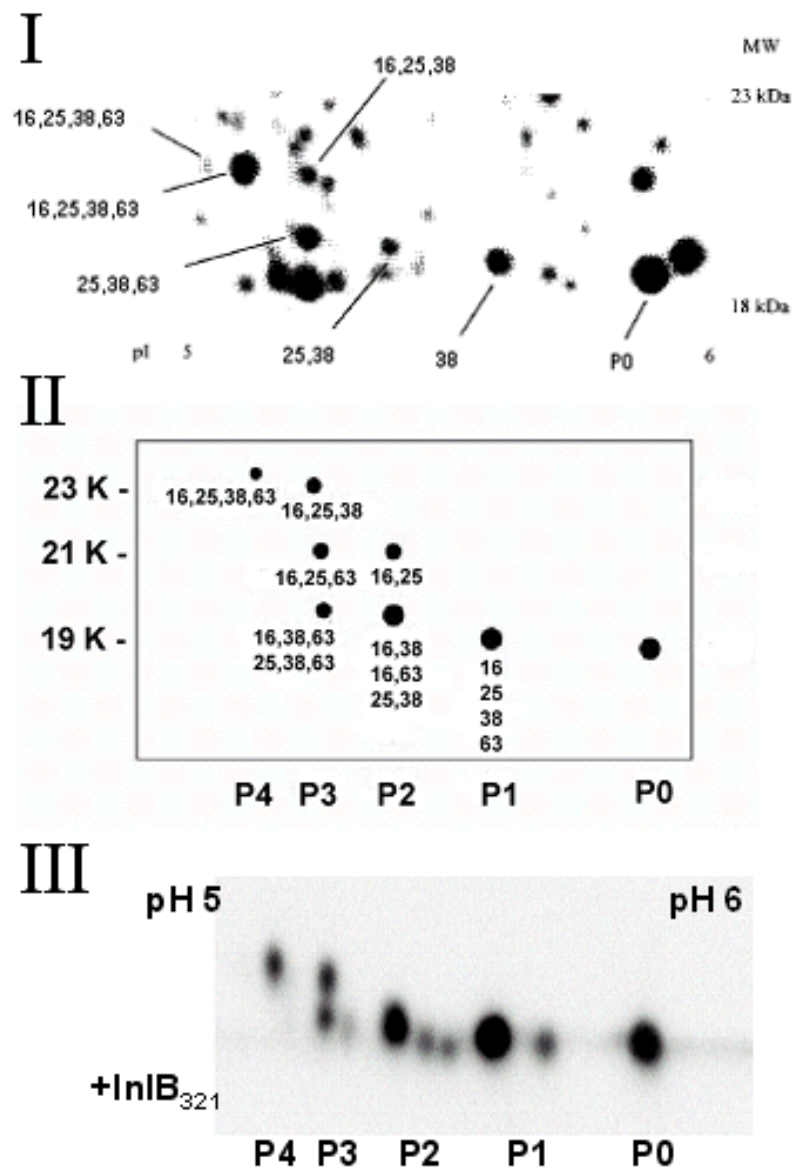


Abb. 4.1: Vergleich von publizierten 2D-Phosphorylierungsmustern und dem erhaltenen Muster nach 30minütiger InIB-Stimulation.

Ein Muster von Stathminisoformen aus einem 2D-Gel gefolgt von MS-Analyse (I) (Muller *et al.*, 1999), ein Schema nach Untersuchung von 2D-Western Blots, die mit Antikörpern gegen spezifische phosphorylierte Stathminisoformen behandelt wurden (II) (Daub *et al.*, 2001) und ein 2D-Western Blot nach InIB-Stimulation aus dieser Arbeit (III) (zur besseren Veranschaulichung wurde dieses Bild in der Vertikalen gestreckt), lassen sich gut miteinander vergleichen.

Die Stimulation von Kulturzellen mit EGF führt zu einer Phosphorylierung von Stathmin über den Rac/Cdc42-Signalweg (Daub *et al.*, 2001). Die nach listerieller Infektion detektierte Phosphorylierung könnte also möglicherweise auf eine Wachstumsfaktor-induzierte Aktivierung von Rac/Cdc42 zurückzuführen sein. Eine

Aktivierung von Rac wurde auch schon nach Bindung von InlB an den Met-Rezeptor beschrieben (Bierne *et al.*, 2001). InlB, ein listeriellies Oberflächenprotein, das über GW-Module im Peptidoglycan verankert ist, liegt zu einem nicht unerheblichen Teil als frei löslicher Virulenzfaktor im Medium vor, wie Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit zeigten, aber auch schon früher beschrieben wurde (Jonquieres *et al.*, 1999). Tatsächlich führten gezielte Induktionsexperimente mit InlB₃₂₁ oder HGF nach 30minütiger Stimulation zu einer stärkeren Induktion der höherphosphorylierten Spezies von Stathmin. Sowohl die dreifach-phosphorylierten Spezies P-Ser16, 25, 38 und P-Ser25, 38, 63, als auch die zweifach-phosphorylierten Isoformen sind im Vergleich zu nicht-behandelten Kontrollzellen induziert (Abb. 3.12). Das Phosphorylierungsmuster von Stathmin unterscheidet sich nach HGF- und InlB-Stimulation nur in einer vermutlich zweifach-phosphorylierten Isoform, die nur nach InlB-Präsentation zu beobachten ist. Dies zeigt, dass InlB für einen Teil der Wirtszellantwort auf listerielle Infektion verantwortlich gemacht werden kann und trotz der Ähnlichkeit des InlB- und HGF-vermittelten „Signallings“ geringe Unterschiede nach HGF- bzw. InlB-Induktion existieren.

Die Phosphorylierung von Stathmin wurde für mehrere zelluläre Prozesse beschrieben und eine ganze Reihe von Kinasen wurden dafür verantwortlich gemacht. So führt eine Stimulation von Kulturzellen mit EGF zu spezifischen Phosphorylierungen an Ser16 durch den Rac/Cdc42-Signalweg (Daub *et al.*, 2001). Ser25 wird über Raf und MAP/ERK phosphoryliert (Lovric *et al.*, 1998) und osmotischer Stress (Parker *et al.*, 1998) sowie chemischer Stress und Hitzeschock (Beretta *et al.*, 1995) führen zu Phosphorylierung an Ser25 und Ser38 durch die MAP Kinase p38. Oxidativer Stress und Induktion der Apoptose durch „Very-low Density Lipoprotein“ wiederum führen zu einer Dephosphorylierung an Ser25 (Yamashita *et al.*, 2002). Für die Phosphorylierung von Ser16 und Ser63, die zur Inaktivierung der Mikrotubuli-destabilisierenden Aktivität von Stathmin führt, wurde eine cAMP-abhängige Proteinkinase verantwortlich gemacht (Gradin *et al.*, 1998) und während des Zellzyklus wird Stathmin mehrmals an den verschiedenen Serinen phosphoryliert (Brattsand *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1994).

Die Phosphorylierungen von Stathmin könnten also auf Stress durch die listerielle Infektion zurückzuführen sein. Das gleichartige Phosphorylierungsmuster nach HGF- und InlB-Stimulation impliziert jedoch, dass *Listeria monocytogenes* über InlB eine Wachstumsfaktor-ähnliche Antwort in den Wirtszellen auslöst und keine

Stressantwort. Ein HGF-ähnliches Signalling nach InIB-Stimulation war schon vorher beschrieben worden (Bierne *et al.*, 2001; Bierne and Cossart, 2002a). So wird beispielsweise sowohl nach InIB- (Bierne *et al.*, 2001) als auch nach HGF-Stimulation (Royal *et al.*, 2000) die kleine GTPase Rac aktiviert.

Rac ist zumeist an Aktincytoskelettveränderungen beteiligt (für Übersichtsartikel siehe: Burridge and Wennerberg, 2004). Für migrierende Zellen (Wittmann and Waterman-Storer, 2001; Wittmann *et al.*, 2003) und in Lamellipodien (Waterman-Storer *et al.*, 1999) wurde aber auch ein Zusammenspiel von Rac, Aktin- und Mikrotubulicytoskelett beschrieben. Das Signalling von Rac kontrolliert auch die Veränderungen des Mikrotubulicytoskeletts, die bei der Internalisierung von *Yersinia pseudotuberculosis* in nicht-professionell phagozytierenden Zellen entstehen (McGee *et al.*, 2003).

Bei der Phagozytose spielen die Mikrotubuli ebenso wie das Aktincytoskelett eine wichtige Rolle bei der Bildung der Pseudopodien, die zur Umschließung des zu phagozytierenden Partikels führen. Innerhalb der Zelle werden Phagosomen - wie Endosomen - entlang der Mikrotubuli Richtung Zellkern transportiert bis sie auf Lysosomen treffen und mit diesen fusionieren (für Übersichtsartikel siehe: Harrison and Grinstein, 2002).

Die Phosphorylierung von Stathmin bei listerieller Infektion und die daraus resultierende stabilisierende Wirkung auf die Mikrotubuli könnte ein wichtiger Prozess bei der Invasion bzw. Phagozytose von Listerien sein. So ist eine listerielle Invasion in Zellen stark reduziert, wenn die Mikrotubuli durch Colchicin und Nocodazol destabilisiert werden (Kuhn, 1998). Auch sind mehrere Pathogene bei der intrazellulären Fortbewegung, bei der Verbreitung in andere Zellen und dem Transport von sekretierten Effektorproteinen in der Wirtszelle von Mikrotubuli abhängig (für Übersichtsartikel und Referenzen siehe: Yoshida and Sasakawa, 2003).

Daher ist die Beteiligung des Mikrotubulicytoskeletts an der Phagozytose von *L. monocytogenes* wahrscheinlich und Mikrotubuli könnten eine bisher unbekannte Rolle bei der listeriellen Invasion spielen.

Die spezifische Phosphorylierung von Stathmin an Ser16 durch die p21-aktivierte Kinase (Pak) (Wittmann *et al.*, 2004) bzw. durch p65-Pak (Daub *et al.*, 2001) über

den Rac-Signalweg, könnte aber auch eine andere Bedeutung haben. Phosphorylierung von Ser16 inhibiert die Mikrotubuli-destabilisierende Aktivität von Stathmin (Wittmann *et al.*, 2004), die eine Voraussetzung für die Einleitung der Mitose ist (Kuntziger *et al.*, 2001). Stathmin, für das schon früher eine Phosphorylierung als Antwort auf Wachstums- und Differentiationsfaktoren gezeigt wurde (Doye *et al.*, 1990), ist weiterhin an mitotischen Prozessen durch die Interaktion mit der KIS-Kinase ('kinase interacting with stathmin') beteiligt (Maucuer *et al.*, 1995; Maucuer *et al.*, 1997), die über Phosphorylierung des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors $p27^{Kip1}$ die Zellzyklusprogression reguliert (Boehm *et al.*, 2002). Ein Einfluß auf Signalkaskaden der Mitose durch die von *Listeria* induzierte Phosphorylierung von Stathmin ist also auch durchaus denkbar (siehe auch Kapitel 4.2.4).

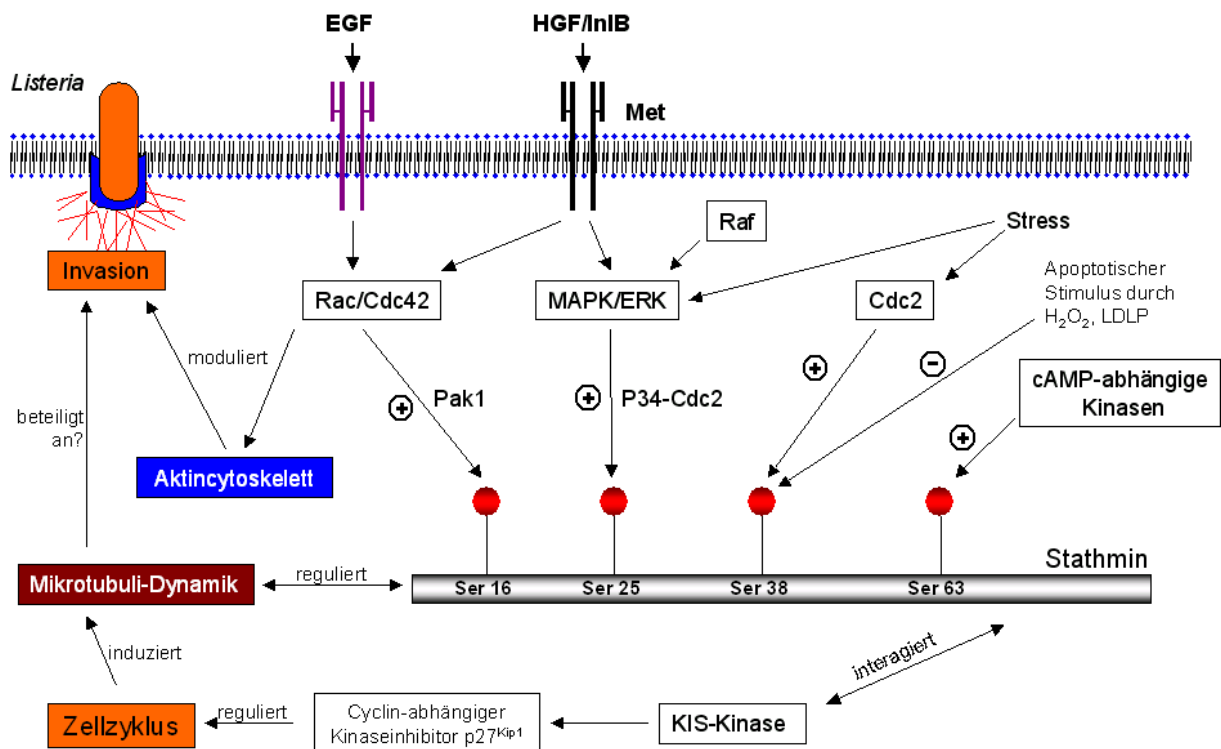


Abb. 4.2: Stathmin, ein Relaisprotein zwischen Mikrotubuli, Aktincytoskelett und Zellzyklus. Stathmin wird nach Wachstumsfaktorstimulation an Ser16 über Rac/Cdc42 und an Ser25 über MAPK/ERK phosphoryliert. Außerdem phosphorylieren es Cdc2 an Ser38 und cAMP-abhängige Kinasen an Ser63. Phosphorylierung von Stathmin inhibiert seine Mikrotubuli-destabilisierende Aktivität und könnte damit einen Einfluß auf die Cytoskelettveränderungen während der listeriellen Invasion besitzen. Weiterhin könnte durch die listerielle Invasion phosphoryliertes Stathmin durch Bindung an die KIS-Kinase und $p27^{Kip1}$ den Zellzyklus regulieren.

4.2.4 Hinweise auf Induktion von anti-apoptotischen Signalwegen in Wirtszellen nach Invasion durch *L. monocytogenes*

Viele intrazelluläre Pathogene können die Apoptose der Wirtszellen verhindern, um Entzündungssignale zu minimieren und dem humoralen Immunsystem zu entkommen. Nicht nur Viren, die befallene Wirtszellen anti-apoptotische Faktoren produzieren lassen können (Clem, 2001; Lee *et al.*, 2001), sondern auch mehrere bakterielle Pathogene können - durch Aktivierung von NFκB - Apoptose verhindern (Wahl *et al.*, 2003; Yanai *et al.*, 2003). Auch in den Experimenten zur Untersuchung der Wirtszellantwort nach listerieller Infektion fiel auf, dass Proteine bzw. Gene induziert waren, deren Funktion mit der Mitose, der Anti-Apoptose oder dem Zellzyklus in Verbindung gebracht werden konnte.

L. monocytogenes induziert Apoptose in Hepatozyten (Rogers *et al.*, 1996), Lymphozyten (Merrick *et al.*, 1997) und dendritischen Zellen (Guzman *et al.*, 1996). Für Makrophagen wurde jedoch ein nicht-apoptotischer Zelltod der Wirtszellen beschrieben (Barsig and Kaufmann, 1997). Verantwortlich für die Induktion der Apoptose wird das sekretierte Protein Listeriolysin (Hly) gemacht (Guzman *et al.*, 1996; Carrero *et al.*, 2004). Allerdings wurde beschrieben, dass Hly im Wirtscytosol schnell aufgrund einer PEST-Sequenz abgebaut wird (Decatur and Portnoy, 2000).

In *L. monocytogenes*-infizierten Zellen wird aber auch die Immunantwort durch Aktivierung des NFκB-Weges induziert (Hauf *et al.*, 1994; Hauf *et al.*, 1997; Kayal *et al.*, 1999; O'Riordan *et al.*, 2002; Baldwin *et al.*, 2003). Aktivierung von NFκB kann den Zelltod über Induktion von anti-apoptotischen Genen wie den zellulären Apoptoseinhibitoren verhindern (cellular inhibitors of apoptosis, c-IAPs), die direkt an Caspasen binden und diese inhibieren (für Übersichtsartikel siehe: Karin and Lin, 2002). So induzieren *Helicobacter pylori* (Yanai *et al.*, 2003) und *Chlamydia pneumoniae* (Wahl *et al.*, 2003) den NFκB-Signalweg und verhindern durch Aktivierung von c-IAP2 Apoptose. Ebenso inhibieren *Chlamydia trachomatis* (Dean and Powers, 2001) oder *Neisseria gonorrhoeae* (Binnicker *et al.*, 2003) Apoptose und mit diesen Bakterien infizierte Zellkulturen sind weniger empfänglich für Staurosporin- oder Etoposid-induzierte Apoptosestimuli.

Verantwortlich für die Induktion von NFκB und anti-apoptotischer Signalwege könnte das Oberflächenprotein InlB sein. InlB induziert NFκB in Makrophagen (Mansell *et al.*, 2000) über die Aktivierung von Ras, Phosphoinositid-3-Kinase (PI-3) und Akt

(Mansell *et al.*, 2001). Akt ist ein wichtiger Regulator/Inhibitor der Apoptose (für Übersichtsartikel siehe: Hemmings, 1997; Fresno Vara *et al.*, 2004).

Bei der Aktivierung dieser Signalwege imitiert InlB offensichtlich den Wachstumsfaktor HGF, die beide an den gleichen Rezeptor binden. HGF ist auch in der Lage, NFkB zu induzieren, und Induktion von NFkB ist essentiell für HGF-induzierte Proliferation (Muller *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2004). Weiterhin aktiviert HGF auch die PI-3-Kinase und Akt und führt dadurch zu einem anti-apoptotischen „Signalling“ (Xiao *et al.*, 2001; Okano *et al.*, 2003; Ozaki *et al.*, 2003; Schulze-Bergkamen *et al.*, 2004).

Das Wachstumsfaktor-ähnliche „Signalling“ durch InlB führt offenbar auch zu einer Induktion der Mitose. Bei den Autoradiographieexperimenten waren hnRPK, eine Proteasomuntereinheit und Stathmin induziert. HnRPK wurde als Wachstumsfaktor-induziert (Mandal *et al.*, 2001) und das Proteasom als Zellzyklusregulator (Adams, 2003) beschrieben. Für Stathmin ist die Phosphorylierung nach Wachstumsfaktor-Stimulation (Doye *et al.*, 1990) und während der Mitose bekannt (Andersen *et al.*, 1997; Mistry *et al.*, 1998; Mistry and Atweh, 2002) (siehe auch Kapitel 4.2.3). Auch die durch ProQ-Experimente identifizierte starke Phosphorylierung von Keratin 8 wird während der Mitose (Liao *et al.*, 1997; Toivola *et al.*, 2002) und durch EGF-Stimulation (Ku and Omary, 1997) induziert.

Vorläufige Daten aus Transkriptionsversuchen weisen ebenso auf eine Induktion anti-apoptotischer Gene hin. So führt der „Connective tissue growth factor“ (CTGF) zu Anti-Apoptose, ohne jedoch die Mitose zu aktivieren (Gygi 2003). Das „Tumor Necrosis Factor (TNF)- Alpha-inducible Protein 3“ reduziert eine NFkB-Induktion und inhibiert ebenso wie das „Immediate-Early Response Gen“ IER3 TNF-induzierte Apoptose (Wu *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000). Das „FOS-like Antigen“ ist ein vermutlicher Transkriptionsregulator und gehört ebenso zu den „Early-Response-Genen“ (Matsuo *et al.*, 2000), wie das „Early Growth Response Gen“ EGR1, das auch durch HGF induziert wird (Recio and Merlino, 2003) und die RelA-Untereinheit von NFkB (Chapman and Perkins, 2000) sowie Apoptose inhibiert (Huang *et al.*, 1998; Adamson and Mercola, 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass einige der experimentellen Daten auf eine Induktion von anti-apoptotischen und mitotischen Signalwegen nach listerieller Infektion hinweisen. Die Einleitung der Mitose überrascht etwas, doch wird auch

durch diese die Apoptose inhibiert. Für die Inhibition der Apoptose während der Zellteilung konnten Li *et al.* das Protein Survivin verantwortlich machen (Li *et al.*, 1998). Diese Induktion der Wirtszellantwort, die der einer Wachstumsfaktor-vermittelten sehr ähnlich ist, könnte auf das listerielle Oberflächenprotein InlB zurückzuführen sein, das ein ähnliches Signalling wie HGF verursacht (Bierne and Cossart, 2002a). Außerdem könnte sich *L. monocytogenes* hierdurch einen wichtigen Vorteil verschaffen, indem es intrazellulär verbleiben und so dem humoralen Immunsystem entkommen könnte.

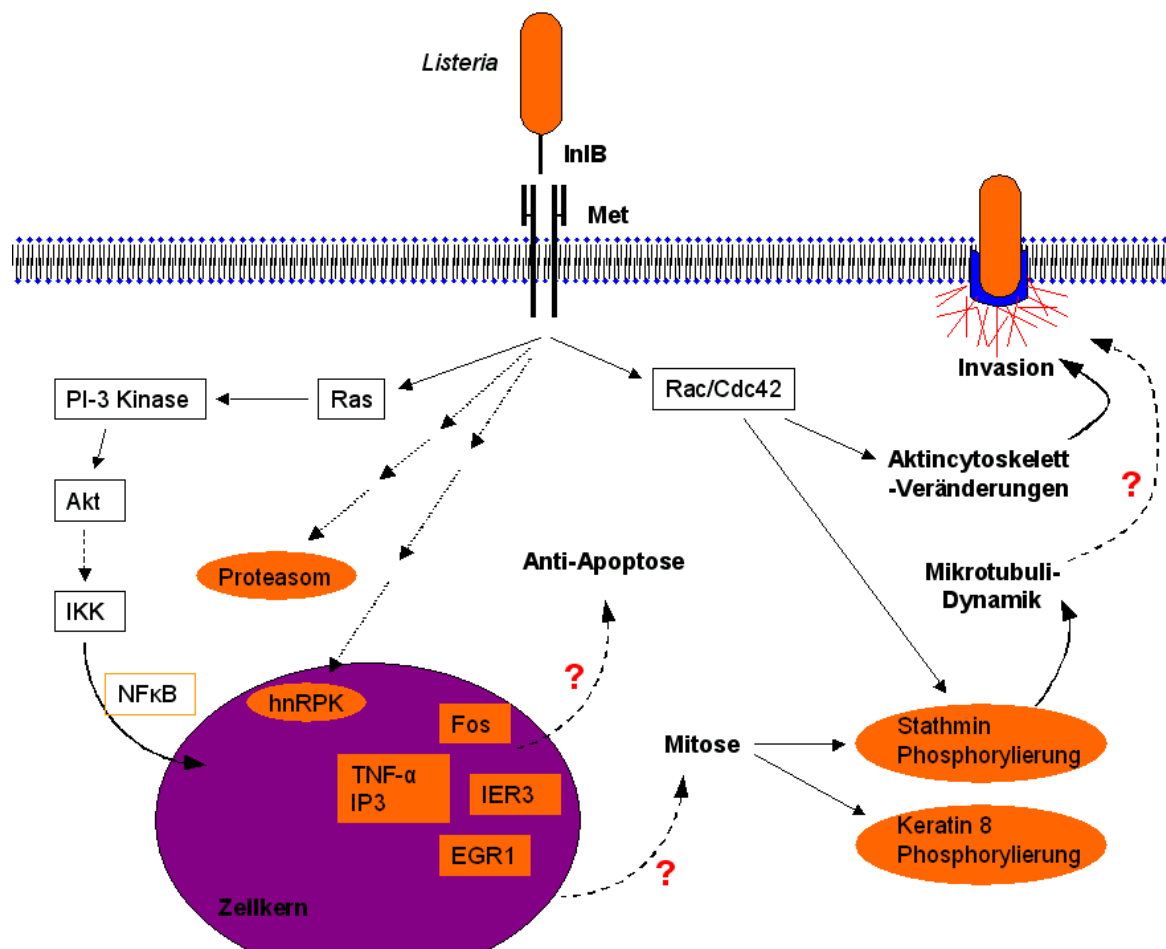


Abb. 4.3: Die in dieser Arbeit gezeigten, durch InlB bzw. *Listeria monocytogenes* induzierten Gene und Proteinphosphorylierungen (in orange).

Nach Bindung von InlB an Met bzw. nach listerieller Invasion werden das Proteasom und hnRPK auf unbekannte Weise induziert. Die Early-Response-Gene Fos, TNF-α-IP3, EGR1 und IER3 werden vermutlich durch den Ras/Akt/NFκB-Weg aktiviert und könnten für die Anti-Apoptose der Zelle verantwortlich sein. Keratin 8 und Stathmin könnten infolge von mitotischen Prozessen phosphoryliert werden. Stathmin könnte aber auch über den Rac/Cdc42-Weg phosphoryliert werden, das einen Einfluß auf die Mikrotubuli während listerieller Invasion haben könnte.

4.3 Ausblick

Die in dieser Arbeit identifizierten LPXTG-Proteine und die in den Sekretomuntersuchungen identifizierten PrfA-abhängigen und *L. monocytogenes*-spezifischen Proteine stellen eine Gruppe von neuen putativen Virulenzfaktoren dar. So sind beispielsweise in der Gruppe der LPXTG-Proteine, einer bisher nur schlecht zugänglichen Proteinuntergruppe, mit Lmo1666 und Lmo0880, die eine hypothetische Cadherin- bzw. eine Collagen-bindende Domäne besitzen, zwei Proteine identifiziert worden, die aufgrund ihrer möglichen Beteiligung an der Wirtszelladhäsion einer näheren Untersuchung bedürfen. Eine Untersuchung von isogenen Deletionsmutanten der betreffenden Gene im Infektionsmodell würde die Einflüsse dieser Proteine auf die Pathogenität offen legen.

Die Identifizierung weiterer PrfA-abhängiger Virulenzfaktoren könnte zu einer Verbesserung der Weight-Matrix der PrfA-Bindestelle genutzt werden, um die Vorhersage von direkt PrfA-regulierten Genen zu verbessern. Des weiteren sollte die PrfA-abhängige Expression von Genen ohne putative PrfA-Bindestelle überprüft werden und untersucht werden, über welche Faktoren das PrfA-Regulon die Expression dieser Gene steuert. Hierbei ist der Sigmafaktor für die generelle Stressantwort, σ^B , der wahrscheinlichste Kandidat, und eine Untersuchung der beiden Regulons könnte Einsichten in die transkriptionelle Kontrolle der Virulenzfaktoren geben.

Die Identifizierung vieler als nicht-sekretorisch vorhergesagter Proteine im Kulturüberstand erfordert eine intensive Untersuchung der listeriellen Sekretionswege. Von Interesse ist, durch welche Kanäle die Proteine transloziert werden, denn für keinen der bekannten listeriellen Sekretionswege außer SecA2 (Lenz *et al.*, 2003) sind hierzu Untersuchungen angestellt worden. Weiterhin müsste untersucht werden, welche Proteine durch Zelllyse in den Überstand gelangen. Hierbei könnte eine zeitaufgelöste Untersuchung der Dynamik der Zelllyse anhand von Markerproteinen hilfreich sein.

Die Untersuchung der Wirtszellantwort auf listerielle Infektion ergab verschiedene Hinweise, die einer weiteren Untersuchung bedürfen. So erfordert die Phosphorylierung des Mikrotubuli-bindenden Proteins Stathmin nach Infektion mit *L. monocytogenes* und nach Stimulation mit InlB oder HGF eine weitere Analyse der *upstream* Kinasen mittels zellbiologischen Methoden. Weiterhin sollte untersucht

werden, inwieweit Mikrotubuli bei der listeriellen Invasion in Wirtszellen eine Rolle spielen. Dies könnte einerseits durch Immunfluoreszenzmikroskopie, andererseits über spezifische Inhibitoren der Mikrotubuli-Dynamik geschehen. Die Untersuchung, inwieweit Stathmin als Relais (Sobel, 1991) für intrazelluläre Signaltransduktion während der listeriellen Infektion dient, könnte mit Zelllinien, in denen Stathmin entweder deletiert wurde bzw. die Phosphorylierungsstellen mutiert wurden, durchgeführt werden.

Ebenfalls einer weiteren Untersuchung bedarf das ähnliche Wirtszellsignalling nach Stimulation durch InIB und HGF. Die Mimikry eines Wachstumsfaktors durch ein bakterielles Protein ist ein bisher einzigartiger Prozess. Proteine wichtiger Signalwege müssten auf deren Aktivierung nach Stimulation mit HGF bzw. InIB mit zellbiologischen Methoden untersucht werden. Hierbei gilt außerdem zu untersuchen, ob es einen Unterschied im „Signalling“ von löslichem bzw. an die Zelloberfläche-gebundenem InIB gibt. Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von HGF- bzw. InIB-stimulierten Zellen wäre die Analyse des Phosphoproteoms, insbesondere das der Plasmamembran. Der Vergleich von Transkriptionsdaten nach HGF- oder InIB-Stimulation bzw. nach Infektion mit *L. monocytogenes* sollte ebenfalls durchgeführt werden.

Eine mögliche Konsequenz der ähnlichen Wirkungsweise von InIB und HGF könnte die Induktion von anti-apoptotischen Signalwegen in der Zelle sein, die *Listeria monocytogenes* Schutz vor dem humoralen Immunsystem geben würde. Mit zellbiologischen Methoden könnte die Aktivierung spezifischer Schlüsselproteine anti-apoptotischer Signalwege analysiert werden sowie die unterschiedliche Toleranz von infizierten bzw. HGF/InIB-stimulierten Zellen auf Apoptose-auslösende Substanzen wie Etoposid untersucht werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der hier vorliegenden Dissertation wurden zwei für das Humanpathogen *L. monocytogenes* wichtige Subproteome sowie die Wirtszellantwort auf Invasion dieses Pathogens mit Methoden der Funktionellen Genomanalyse untersucht.

Für die Untersuchungen wurde die Gel-lose Proteomanalyse mittels LC-MS/MS etabliert. Mit dieser Methode gelang erstmals, das schwer zugängliche Subproteom der kovalent-gebundenen Zellwandproteine von *L. monocytogenes* zu untersuchen und 6 LPXTG-Proteine wurden identifiziert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese für die Pathogenität von *Listeria monocytogenes* wichtige Proteinklasse über das Enzym Sortase A an das Peptidoglycan verknüpft wird (Bierne *et al.*, 2002b)

Einen weiteren Teil dieser Arbeit bildete die Untersuchung der sekretorischen Proteine von *Listeria monocytogenes*. Durch einen bioinformatischen Ansatz wurden 121 Proteine als sekretiert vorhergesagt und die ursprüngliche Vorhersage der Genomannotierung (Glaser *et al.*, 2001), die nur 86 Proteine identifizierte, erheblich verbessert. Die schon für die LPXTG-Proteine erfolgreich verwendete Gel-lose Proteommethode der LC-MS/MS wurde auch für dieses Subproteom verwendet. In Kombination mit 2D-Gelelektrophorese wurden 105 Proteine identifiziert, darunter alle primären Virulenzfaktoren, was die Bedeutsamkeit dieses Subproteoms unterstreicht.

Allen primären Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* sind zwei Eigenschaften gemein: sie werden durch den Transkriptionsregulator PrfA positiv reguliert und ihre jeweiligen Gene sind in der apathogenen Art *L. innocua* nicht vorhanden. Zur Identifikation neuer Virulenzfaktoren wurden deshalb die Kulturüberstandsproteine des wt und einer *prfA*-Deletionsmutante untersucht. Durch diesen Vergleich konnte die PrfA-abhängige Expression der primären Virulenzfaktoren bestätigt werden und 13 weitere putativ PrfA-regulierte Proteine identifiziert werden.

Der Vergleich der Überstandsproteine der apathogenen Art *L. innocua* mit *L. monocytogenes* zeigte die unterschiedliche Adaption der beiden Spezies an ihre jeweilige Umgebung. Neben den 8 primären Virulenzfaktoren wurden 8 weitere Proteine identifiziert, die ebenfalls keine orthologen Gene in der apathogenen Art *L. innocua* besitzen.

Die neuen als PrfA-abhängig identifizierten und *L. monocytogenes*-spezifischen Proteine sind Faktoren, die aktiv oder modulierend auf die Pathogenität von *L.*

monocytogenes wirken könnten, und stellen nun die Basis für weitere Untersuchungen dar.

Nach der Untersuchung der sekretorischen Proteine, die ein wichtiges Subproteom für die Interaktion mit dem Wirt darstellen, wurden Proteom- und Transkriptionsuntersuchungen von mit *L. monocytogenes* infizierten Zelllinien durchgeführt. Hierzu wurden die differentielle Expressionsanalyse und die Phosphoproteomanalyse von eukaryontischen Zellextrakten etabliert.

Bei Proteom- und ersten Transkriptionsuntersuchungen von infizierten HeLa-Zellen wurden mehrere Hinweise gefunden, dass während der listeriellen Invasion anti-apoptotische Signalwege in den Wirtszellen induziert sein könnten. Das Überleben der Zellen böte *L. monocytogenes* Schutz vor dem humoralen Immunsystem und wäre ein wichtiger Vorteil bei der Infektion.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Mikrotubuli-destabilisierende Protein Stathmin durch Infektion mit Listerien spezifisch phosphoryliert und damit inhibiert wird. Die Vermutung, dass für diese Phosphorylierung die Aktivierung des Wirtsrezeptors Met durch das Oberflächenprotein InlB verantwortlich ist, konnte durch die Präsentation von rekombinaten InlB und des natürlichen Liganden von Met, HGF, bestätigt werden.

6. LITERATUR

- Abbi, S., Ueda, H., Zheng, C., Cooper, L. A., Zhao, J., Christopher, R., and Guan, J. L.,**
Regulation of focal adhesion kinase by a novel protein inhibitor FIP200, *Mol.Biol.Cell*, **13** [9], 3178-3191, (2002)
- Adams, J.,**
The proteasome: structure, function, and role in the cell, *Cancer Treat.Rev.*, **29 Suppl 1**, 3-9, (2003)
- Adamson, E. D. and Mercola, D.,**
Egr1 transcription factor: multiple roles in prostate tumor cell growth and survival, *Tumour.Biol.*, **23** [2], 93-102 (2002).
- Alrutz, M. A. and Isberg, R. R.,**
Involvement of focal adhesion kinase in invasin-mediated uptake, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **95** [23], 13658-13663 (1998).
- Andersen, S. S., Ashford, A. J., Tournebize, R., Gavet, O., Sobel, A., Hyman, A. A., and Karsenti, E.,**
Mitotic chromatin regulates phosphorylation of Stathmin/Op18, *Nature*, **389** [6651], 640-643, (1997)
- Andersen, S. S.,**
Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18, *Trends Cell Biol.*, **10** [7], 261-267, (2000)
- Andrade, M. A., Ciccarelli, F. D., Perez-Iratxeta, C., and Bork, P.,**
NEAT: a domain duplicated in genes near the components of a putative Fe³⁺ siderophore transporter from Gram-positive pathogenic bacteria, *Genome Biol.*, **3** [9], 47, (2002)
- Antelmann, H., Tjalsma, H., Voigt, B., Ohlmeier, S., Bron, S., van Dijk, J. M., and Hecker, M.,**
A proteomic view on genome-based signal peptide predictions, *Genome Res.*, **11** [9], 1484-1502, (2001)
- Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Birney, E., Biswas, M., Bucher, P., Cerutti, L., Corpet, F., Croning, M. D., Durbin, R., Falquet, L., Fleischmann, W., Gouzy, J., Hermjakob, H., Hulo, N., Jonassen, I., Kahn, D., Kanapin, A., Karavidopoulou, Y., Lopez, R., Marx, B., Mulder, N. J., Oinn, T. M., Pagni, M., Servant, F., Sigrist, C. J., and Zdobnov, E. M.,**
InterPro--an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites, *Bioinformatics.*, **16** [12], 1145-1150 (2000).
- Autret, N., Raynaud, C., Dubail, I., Berche, P., and Charbit, A.,**
Identification of the agr Locus of *Listeria monocytogenes*: Role in Bacterial Virulence, *Infect.Immun.*, **71** [8], 4463-4471 (2003).
- Avizienyte, E., Wyke, A. W., Jones, R. J., McLean, G. W., Westhoff, M. A., Brunton, V. G., and Frame, M. C.,**
Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling, *Nat.Cell Biol.*, **4** [8], 632-638 (2002).
- Baldwin, D. N., Vanchinathan, V., Brown, P. O., and Theriot, J. A.,**
A gene-expression program reflecting the innate immune response of cultured intestinal epithelial cells to infection by *Listeria monocytogenes*, *Genome Biol.*, **4** [1], R2, (2003)
- Banerjee, M., Copp, J., Vuga, D., Marino, M., Chapman, T., van der Geer, P., and Ghosh, P.,**
GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are required for potentiation of Met activation, *Mol.Microbiol.*, **52** [1], 257-271, (2004)

- Barsig, J. and Kaufmann, S. H.,**
The mechanism of cell death in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages is distinct from apoptosis, *Infect.Immun.*, **65** [10], 4075-4081 (1997).
- Bass, R., Fernandez, A. M., and Ellis, V.,**
Maspin inhibits cell migration in the absence of protease inhibitory activity, *J.Biol.Chem.*, **277** [49], 46845-46848, (2002)
- Baumgärtner, M.,**
Membranproteomanalyse des fakultativ intrazellulären Erregers *Listeria monocytogenes*,
Dissertation, Braunschweig, 2004
- Beissinger, M. and Buchner, J.,**
How chaperones fold proteins, *Biol.Chem.*, **379** [3], 245-259, (1998)
- Belmont, L. D. and Mitchison, T. J.,**
Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules, *Cell*, **84** [4], 623-631, (1996)
- Benn, S. C., Perrelet, D., Kato, A. C., Scholz, J., Decosterd, I., Mannion, R. J., Bakowska, J. C., and Woolf, C. J.,**
Hsp27 upregulation and phosphorylation is required for injured sensory and motor neuron survival, *Neuron*, **36** [1], 45-56, (2002)
- Beretta, L., Dobransky, T., and Sobel, A.,**
Multiple phosphorylation of stathmin. Identification of four sites phosphorylated in intact cells and in vitro by cyclic AMP-dependent protein kinase and p34cdc2, *J.Biol.Chem.*, **268** [27], 20076-20084, (1993)
- Beretta, L., Dubois, M. F., Sobel, A., and Bensaude, O.,**
Stathmin is a major substrate for mitogen-activated protein kinase during heat shock and chemical stress in HeLa cells, *Eur.J.Biochem.*, **227** [1-2], 388-395 (1995).
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G. S., and Hammerschmidt, S.,**
alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface, *Mol.Microbiol.*, **40** [6], 1273-1287 (2001).
- Bergmann, S., Wild, D., Diekmann, O., Frank, R., Bracht, D., Chhatwal, G. S., and Hammerschmidt, S.,**
Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae*, *Mol.Microbiol.*, **49** [2], 411-423 (2003).
- Berks, B. C., Sargent, F., and Palmer, T.,**
The Tat protein export pathway, *Mol.Microbiol.*, **35** [2], 260-274, (2000)
- Bernardini, M. L., Mounier, J., d'Hauteville, H., Coquis-Rondon, M., and Sansonetti, P. J.,**
Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **86** [10], 3867-3871, (1989)
- Bierne, H., Gouin, E., Roux, P., Caroni, P., Yin, H. L., and Cossart, P.,**
A role for cofilin and LIM kinase in *Listeria*-induced phagocytosis, *J.Cell Biol.*, **155** [1], 101-112, (2001)
- Bierne, H. and Cossart, P.,**
InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor, *J.Cell Sci.*, **115** [Pt 17], 3357-3367, (2002a)

- Bierne, H., Mazmanian, S. K., Trost, M., Pucciarelli, M. G., Liu, G., Dehoux, P., Jansch, L., Garcia-del Portillo, F., Schneewind, O., and Cossart, P.,**
Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence, *Mol.Microbiol.*, **43** [4], 869-881, (2002b)
- Bierne, H., Garandeau, C., Pucciarelli, M. G., Sabet, C., Newton, S., Garcia-del Portillo, F., Cossart, P., and Charbit, A.,**
Sortase B, a new class of sortase in *Listeria monocytogenes*, *J.Bacteriol.*, **186** [7], 1972-1982, (2004)
- Binnicker, M. J., Williams, R. D., and Apicella, M. A.,**
Infection of human urethral epithelium with *Neisseria gonorrhoeae* elicits an upregulation of host anti-apoptotic factors and protects cells from staurosporine-induced apoptosis, *Cell Microbiol.*, **5** [8], 549-560 (2003).
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., and Vande Woude, G. F.,**
Met, metastasis, motility and more, *Nat.Rev.Mol Cell Biol.*, **4** [12], 915-925, (2003)
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P. G., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R., and Postel, W.,**
Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications, *J.Biochem.Biophys.Methods*, **6** [4], 317-339, (1982)
- Bleves, S., Voulhoux, R., Michel, G., Lazdunski, A., Tommassen, J., and Filloux, A.,**
The secretion apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of a fifth pseudopilin, XcpX (GspK family), *Mol.Microbiol.*, **27** [1], 31-40, (1998)
- Bodnar, J. S., Chatterjee, A., Castellani, L. W., Ross, D. A., Ohmen, J., Cavalcoli, J., Wu, C., Dains, K. M., Catanese, J., Chu, M., Sheth, S. S., Charugundla, K., Demant, P., West, D. B., de Jong, P., and Lusi, A. J.,**
Positional cloning of the combined hyperlipidemia gene *Hyplip1*, *Nat.Genet.*, **30** [1], 110-116, (2002)
- Boehm, M., Yoshimoto, T., Crook, M. F., Nallamshetty, S., True, A., Nabel, G. J., and Nabel, E. G.,**
A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression, *EMBO J.*, **21** [13], 3390-3401 (2002).
- Boel, G., Pichereau, V., Mijakovic, I., Maze, A., Poncet, S., Gillet, S., Giard, J. C., Hartke, A., Auffray, Y., and Deutscher, J.,**
Is 2-phosphoglycerate-dependent automodification of bacterial enolases implicated in their export?, *J.Mol.Biol.*, **337** [2], 485-496 (2004).
- Boelens, W. C., Van Boekel, M. A., and De Jong, W. W.,**
HspB3, the most deviating of the six known human small heat shock proteins, *Biochim.Biophys.Acta*, **1388** [2], 513-516, (1998)
- Bohne, J., Sokolovic, Z., and Goebel, W.,**
Transcriptional regulation of *prfA* and *PrfA*-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*, *Mol.Microbiol.*, **11** [6], 1141-1150, (1994)
- Bonnemain, C., Raynaud, C., Reglier-Poupet, H., Dubail, I., Frehel, C., Lety, M. A., Berche, P., and Charbit, A.,**
Differential roles of multiple signal peptidases in the virulence of *Listeria monocytogenes*, *Mol.Microbiol.*, **51** [5], 1251-1266, (2004)
- Borezee, E., Pellegrini, E., and Berche, P.,**
OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival, *Infect.Immun.*, **68** [12], 7069-7077, (2000)

- Bradford, M. M.,**
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal.Biochem.*, **72**, 248-254, (1976)
- Brancia, F. L., Oliver, S. G., and Gaskell, S. J.,**
Improved matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of tryptic hydrolysates of proteins following guanidination of lysine-containing peptides, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **14** [21], 2070-3, (2000)
- Brattsand, G., Marklund, U., Nylander, K., Roos, G., and Gullberg, M.,**
Cell-cycle-regulated phosphorylation of oncoprotein 18 on Ser16, Ser25 and Ser38, *Eur.J.Biochem.*, **220** [2], 359-368 (1994).
- Braun, L., Ghebrehiwet, B., and Cossart, P.,**
gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*, *EMBO J.*, **19** [7], 1458-1466, (2000)
- Braun, L., Ohayon, H., and Cossart, P.,**
The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells, *Mol Microbiol*, **27** [5], 1077-87, (1998)
- Braunstein, M., Brown, A. M., Kurtz, S., and Jacobs, W. R., Jr.,**
Two nonredundant SecA homologues function in mycobacteria, *J.Bacteriol.*, **183** [24], 6979-6990, (2001)
- Braunstein, M., Espinosa, B. J., Chan, J., Belisle, J. T., and Jacobs, R.,**
SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mol.Microbiol.*, **48** [2], 453-464 (2003).
- Budde, P. P., Kumagai, A., Dunphy, W. G., and Heald, R.,**
Regulation of Op18 during spindle assembly in *Xenopus* egg extracts, *J.Cell Biol.*, **153** [1], 149-158, (2001)
- Bumann, D., Aksu, S., Wendland, M., Janek, K., Zimny-Arndt, U., Sabarth, N., Meyer, T. F., and Jungblut, P. R.,**
Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*, *Infect.Immun.*, **70** [7], 3396-3403 (2002).
- Burridge, K. and Wennerberg, K.,**
Rho and Rac take center stage, *Cell*, **116** [2], 167-179 (2004).
- Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L., and Cossart, P.,**
Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*, *Trends Microbiol*, **10** [5], 238-45, (2002)
- Cabanes, D., Dussurget, O., Dehoux, P., and Cossart, P.,**
Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence, *Mol.Microbiol.*, **51** [6], 1601-1614 (2004).
- Cagney, G. and Emili, A.,**
De novo peptide sequencing and quantitative profiling of complex protein mixtures using mass-coded abundance tagging, *Nat Biotechnol*, **20** [2], 163-70, (2002)
- Cala, S. E., Ulbright, C., Kelley, J. S., and Jones, L. R.,**
Purification of a 90-kDa protein (Band VII) from cardiac sarcoplasmic reticulum. Identification as calnexin and localization of casein kinase II phosphorylation sites, *J.Biol.Chem.*, **268** [4], 2969-2975 (1993).
- Cameron, L. A., Footer, M. J., van Oudenaarden, A., and Theriot, J. A.,**
Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96** [9], 4908-4913, (1999)

- Camilli, A., Goldfine, H., and Portnoy, D. A.,**
Listeria monocytogenes mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent, *J.Exp.Med.*, **173** [3], 751-754, (1991)
- Carrero, J. A., Calderon, B., and Unanue, E. R.,**
Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* is a lymphocyte apoptogenic molecule, *J.Immunol.*, **172** [8], 4866-4874 (2004).
- Carroll, S. A., Hain, T., Technow, U., Darji, A., Pashalidis, P., Joseph, S. W., and Chakraborty, T.,**
Identification and Characterization of a Peptidoglycan Hydrolase, MurA, of *Listeria monocytogenes*, a Muramidase Needed for Cell Separation, *J.Bacteriol.*, **185** [23], 6801-6808, (2003)
- Chaddock, A. M., Mant, A., Karnauchov, I., Brink, S., Herrmann, R. G., Klosgen, R. B., and Robinson, C.,**
A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase, *EMBO J.*, **14** [12], 2715-2722, (1995)
- Chakraborty, T., Ebel, F., Domann, E., Niebuhr, K., Gerstel, B., Pistor, S., Temm-Grove, C. J., Jockusch, B. M., Reinhard, M., Walter, U., and .,**
A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells, *EMBO J.*, **14** [7], 1314-1321, (1995)
- Chano, T., Ikegawa, S., Kontani, K., Okabe, H., Baldini, N., and Saeki, Y.,**
Identification of RB1CC1, a novel human gene that can induce RB1 in various human cells, *Oncogene*, **21** [8], 1295-1298, (2002a)
- Chano, T., Kontani, K., Teramoto, K., Okabe, H., and Ikegawa, S.,**
Truncating mutations of RB1CC1 in human breast cancer, *Nat.Genet.*, **31** [3], 285-288, (2002b)
- Chapman, N. R. and Perkins, N. D.,**
Inhibition of the RelA(p65) NF-kappaB subunit by Egr-1, *J.Biol.Chem.*, **275** [7], 4719-4725 (2000).
- Chico-Calero, I., Suarez, M., Gonzalez-Zorn, B., Scortti, M., Slaghuys, J., Goebel, W., and Vazquez-Boland, J. A.,**
Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **99** [1], 431-436, (2002)
- Chung, Y. J., Steen, M. T., and Hansen, J. N.,**
The subtilin gene of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 is encoded in an operon that contains a homolog of the hemolysin B transport protein, *J.Bacteriol.*, **174** [4], 1417-1422, (1992)
- Chung, Y. S. and Dubnau, D.,**
ComC is required for the processing and translocation of comGC, a pilin-like competence protein of *Bacillus subtilis*, *Mol.Microbiol.*, **15** [3], 543-551 (1995).
- Chung, Y. S., Breidt, F., and Dubnau, D.,**
Cell surface localization and processing of the ComG proteins, required for DNA binding during transformation of *Bacillus subtilis*, *Mol.Microbiol.*, **29** [3], 905-913, (1998)
- Clem, R. J.,**
Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly, *Cell Death.Differ.*, **8** [2], 137-143 (2001).
- Cohen, P., Bouaboula, M., Bellis, M., Baron, V., Jbilo, O., Poinot-Chazel, C., Galiegue, S., Hadibi, E. H., and Casellas, P.,**
Monitoring cellular responses to *Listeria monocytogenes* with oligonucleotide arrays, *J.Biol.Chem.*, **275** [15], 11181-11190, (2000)

- Cool, R. H., Jensen, M., Jonak, J., Clark, B. F., and Parmeggiani, A.,**
Substitution of proline 82 by threonine induces autophosphorylating activity in GTP-binding domain of elongation factor Tu, *J.Biol.Chem.*, **265** [12], 6744-6749 (1990).
- Cossart, P. and Kocks, C.,**
The actin-based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*, *Mol.Microbiol.*, **13** [3], 395-402, (1994)
- Cossart, P. and Bierne, H.,**
The use of host cell machinery in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*, *Curr Opin Immunol*, **13** [1], 96-103, (2001)
- Cossart, P., Pizarro-Cerda, J., and Lecuit, M.,**
Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions, *Trends Cell Biol.*, **13** [1], 23-31 (2003).
- Cossart, P. and Sansonetti, P. J.,**
Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens, *Science*, **304** [5668], 242-248, (2004)
- Cristobal, S., de Gier, J. W., Nielsen, H., and von Heijne, G.,**
Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*, *EMBO J.*, **18** [11], 2982-2990, (1999)
- Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A., and Hall, A.,**
Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16, *J.Biol.Chem.*, **276** [3], 1677-1680, (2001)
- Dean, D. and Powers, V. C.,**
Persistent *Chlamydia trachomatis* infections resist apoptotic stimuli, *Infect.Immun.*, **69** [4], 2442-2447 (2001).
- Decatur, A. L. and Portnoy, D. A.,**
A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity, *Science*, **290** [5493], 992-995 (2000).
- Dejgaard, K., Leffers, H., Rasmussen, H. H., Madsen, P., Kruse, T. A., Gesser, B., Nielsen, H., and Celis, J. E.,**
Identification, molecular cloning, expression and chromosome mapping of a family of transformation upregulated hnRNP-K proteins derived by alternative splicing, *J.Mol.Biol.*, **236** [1], 33-48, (1994)
- Dhar, G., Faull, K. F., and Schneewind, O.,**
Anchor structure of cell wall surface proteins in *Listeria monocytogenes*, *Biochemistry*, **39** [13], 3725-3733, (2000)
- Di Paolo, G., Antonsson, B., Kassel, D., Riederer, B. M., and Grenningloh, G.,**
Phosphorylation regulates the microtubule-destabilizing activity of stathmin and its interaction with tubulin, *FEBS Lett.*, **416** [2], 149-152, (1997)
- Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wachter, M., Wuenscher, M., and Chakraborty, T.,**
A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin, *EMBO J.*, **11** [5], 1981-1990, (1992)
- Domann, E., Zechel, S., Lingnau, A., Hain, T., Darji, A., Nichterlein, T., Wehland, J., and Chakraborty, T.,**
Identification and characterization of a novel PrfA-regulated gene in *Listeria monocytogenes* whose product, IrpA, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine-rich repeats, *Infect.Immun.*, **65** [1], 101-109 (1997).

- Doye, V., Bouterin, M. C., and Sobel, A.,**
Phosphorylation of stathmin and other proteins related to nerve growth factor-induced regulation of PC12 cells, *J.Biol.Chem.*, **265** [20], 11650-11655 (1990).
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P., and Cossart, P.,**
Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of *inlB*, a surface protein of the internalin multigene family, *Mol.Microbiol.*, **16** [2], 251-261, (1995)
- Dramsi, S., Kocks, C., Forestier, C., and Cossart, P.,**
Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator *prfA*, *Mol.Microbiol.*, **9** [5], 931-941, (1993)
- Edelson, B. T. and Unanue, E. R.,**
Immunity to *Listeria* infection, *Curr.Opin.Immunol.*, **12** [4], 425-431, (2000)
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., and Kirschner, M. W.,**
Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck, *Nature*, **418** [6899], 790-793 (2002).
- Eferl, R., Ricci, R., Kenner, L., Zenz, R., David, J. P., Rath, M., and Wagner, E. F.,**
Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53, *Cell*, **112** [2], 181-192, (2003)
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M.,**
Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science*, **246** [4926], 64-71, (1989)
- Ferretti, J. J., McShan, W. M., Ajdic, D., Savic, D. J., Savic, G., Lyon, K., Primeaux, C., Sezate, S., Suvorov, A. N., Kenton, S., Lai, H. S., Lin, S. P., Qian, Y., Jia, H. G., Najar, F. Z., Ren, Q., Zhu, H., Song, L., White, J., Yuan, X., Clifton, S. W., Roe, B. A., and McLaughlin, R.,**
Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **98** [8], 4658-4663, (2001)
- Fischetti, V. A., Pancholi, V., and Schneewind, O.,**
Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci, *Mol.Microbiol.*, **4** [9], 1603-1605, (1990)
- Flock, J. I., Froman, G., Jonsson, K., Guss, B., Signas, C., Nilsson, B., Raucci, G., Hook, M., Wadstrom, T., and Lindberg, M.,**
Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*, *EMBO J.*, **6** [8], 2351-2357 (1987).
- Foster, L. J., De Hoog, C. L., and Mann, M.,**
Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **100** [10], 5813-5818 (2003).
- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and Gonzalez-Baron, M.,**
PI3K/Akt signalling pathway and cancer, *Cancer Treat.Rev.*, **30** [2], 193-204 (2004).
- Furge, K. A., Zhang, Y. W., and Vande Woude, G. F.,**
Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins, *Oncogene*, **19** [49], 5582-5589, (2000)
- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P. H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J. J., and Desjardins, M.,**
Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages, *Cell*, **110** [1], 119-131, (2002)

- Gaillard, J. L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., and Cossart, P.,**
Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci, *Cell*, **65** [7], 1127-1141, (1991)
- Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C., and Desjardins, M.,**
The phagosome proteome: insight into phagosome functions, *J. Cell Biol.*, **152** [1], 165-180, (2001)
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M. A., Copley, R. R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., and Superti-Furga, G.,**
Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes, *Nature*, **415** [6868], 141-147, (2002)
- Geoffroy, C., Gaillard, J. L., Alouf, J. E., and Berche, P.,**
Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*, *Infect. Immun.*, **55** [7], 1641-1646, (1987)
- Geoffroy, C., Gaillard, J. L., Alouf, J. E., and Berche, P.,**
Production of thiol-dependent haemolysins by *Listeria monocytogenes* and related species, *J. Gen. Microbiol.*, **135** (Pt 3), 481-487, (1989)
- Gertler, F. B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J., and Soriano, P.,**
Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics, *Cell*, **87** [2], 227-239, (1996)
- Gey Van Pittius, N. C., Gamielidien, J., Hide, W., Brown, G. D., Siezen, R. J., and Beyers, A. D.,**
The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria, *Genome Biol.*, **2** [10], (2001)
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K. D., Fsihi, H., Portillo, F. G., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L. M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J. M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J. C., Purcell, R., Rammel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J. A., Voss, H., Wehland, J., and Cossart, P.,**
Comparative genomics of *Listeria* species, *Science*, **294** [5543], 849-852, (2001)
- Gohmann, S., Leimeister-Wachter, M., Schiltz, E., Goebel, W., and Chakraborty, T.,**
Characterization of a *Listeria monocytogenes*-specific protein capable of inducing delayed hypersensitivity in *Listeria*-immune mice, *Mol. Microbiol.*, **4** [7], 1091-1099 (1990).
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., and Weiss, W.,**
The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, *Electrophoresis*, **21** [6], 1037-1053, (2000)
- Gradin, H. M., Larsson, N., Marklund, U., and Gullberg, M.,**
Regulation of microtubule dynamics by extracellular signals: cAMP-dependent protein kinase switches off the activity of oncoprotein 18 in intact cells, *J. Cell Biol.*, **140** [1], 131-141, (1998)

- Greiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K. S., Weiglein, I., Bubert, A., Engelbrecht, F., Stins, M., and Kuhn, M.,**
Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InIB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells, *Infect.Immun.*, **66** [11], 5260-5267, (1998)
- Guzman, C. A., Domann, E., Rohde, M., Bruder, D., Darji, A., Weiss, S., Wehland, J., Chakraborty, T., and Timmis, K. N.,**
Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*, *Mol.Microbiol.*, **20** [1], 119-126 (1996).
- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., and Aebersold, R.,**
Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags, *Nat Biotechnol*, **17** [10], 994-9, (1999)
- Harrison, R. E. and Grinstein, S.,**
Phagocytosis and the microtubule cytoskeleton, *Biochem.Cell Biol.*, **80** [5], 509-515 (2002).
- Hauf, N., Goebel, W., Fiedler, F., Sokolovic, Z., and Kuhn, M.,**
Listeria monocytogenes infection of P388D1 macrophages results in a biphasic NF-kappaB (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by IkappaBalpha and IkappaBbeta degradation, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **94** [17], 9394-9399 (1997).
- Hauf, N., Goebel, W., Serfling, E., and Kuhn, M.,**
Listeria monocytogenes infection enhances transcription factor NF-kappa B in P388D1 macrophage-like cells, *Infect.Immun.*, **62** [7], 2740-2747 (1994).
- He, T., Stepulak, A., Holmstrom, T. H., Omary, M. B., and Eriksson, J. E.,**
The intermediate filament protein keratin 8 is a novel cytoplasmic substrate for c-Jun N-terminal kinase, *J.Biol.Chem.*, **277** [13], 10767-10774, (2002)
- Heinzen, R. A., Hayes, S. F., Peacock, M. G., and Hackstadt, T.,**
Directional actin polymerization associated with spotted fever group Rickettsia infection of Vero cells, *Infect.Immun.*, **61** [5], 1926-1935, (1993)
- Hemmings, B. A.,**
Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions, *Science*, **275** [5300], 628-630 (1997).
- Herbert, B., Hopwood, F., Oxley, D., McCarthy, J., Laver, M., Grinyer, J., Goodall, A., Williams, K., Castagna, A., and Righetti, P. G.,**
Beta-elimination: an unexpected artefact in proteome analysis, *Proteomics.*, **3** [6], 826-831, (2003)
- Herskovits, A. A., Bochkareva, E. S., and Bibi, E.,**
New prospects in studying the bacterial signal recognition particle pathway, *Mol.Microbiol.*, **38** [5], 927-939, (2000)
- Hirose, I., Sano, K., Shioda, I., Kumano, M., Nakamura, K., and Yamane, K.,**
Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study, *Microbiology*, **146** (Pt 1), 65-75, (2000)

- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreau, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A. R., Sassi, H., Nielsen, P. A., Rasmussen, K. J., Andersen, J. R., Johansen, L. E., Hansen, L. H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B. D., Matthiesen, J., Hendrickson, R. C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M. F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C. W., Figeys, D., and Tyers, M.,**
Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry, *Nature*, **415** [6868], 180-183, (2002)
- Hoving, S., Gerrits, B., Voshol, H., Muller, D., Roberts, R. C., and van Oostrum, J.,**
Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients, *Proteomics*, **2** [2], 127-34, (2002)
- Huang, R. P., Fan, Y., deBelle, I., Ni, Z., Matheny, W., and Adamson, E. D.,**
Egr-1 inhibits apoptosis during the UV response: correlation of cell survival with Egr-1 phosphorylation, *Cell Death.Differ.*, **5** [1], 96-106 (1998).
- Huang, Y., Yario, T. A., and Steitz, J. A.,**
A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **101** [26], 9666-9670 (2004).
- Huber, L. A.,**
Is proteomics heading in the wrong direction?, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **4** [1], 74-80, (2003)
- Hussain, M., Heilmann, C., Peters, G., and Herrmann, M.,**
Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin, *Microb.Pathog.*, **31** [6], 261-270 (2001).
- Ikai, K. and McGuire, J. S.,**
Phosphorylation of keratin polypeptides, *Biochim.Biophys.Acta*, **760** [3], 371-376 (1983).
- Ireton, K., Payraastre, B., and Cossart, P.,**
The *Listeria monocytogenes* protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase, *J.Biol.Chem.*, **274** [24], 17025-17032, (1999)
- Ishibashi, T., Bottaro, D. P., Michieli, P., Kelley, C. A., and Aaronson, S. A.,**
A novel dual specificity phosphatase induced by serum stimulation and heat shock, *J.Biol.Chem.*, **269** [47], 29897-29902, (1994)
- Jacobs, M., Andersen, J. B., Kontinen, V., and Sarvas, M.,**
Bacillus subtilis PrsA is required in vivo as an extracytoplasmic chaperone for secretion of active enzymes synthesized either with or without pro-sequences, *Mol.Microbiol.*, **8** [5], 957-966, (1993)
- Jeffery, C. J.,**
Moonlighting proteins, *Trends Biochem.Sci.*, **24** [1], 8-11 (1999).
- Jeffery, C. J.,**
Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks, *Trends Genet.*, **19** [8], 415-417 (2003).
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., and Cossart, P.,**
An RNA Thermosensor Controls Expression of Virulence Genes in *Listeria monocytogenes*, *Cell*, **110** [5], 551, (2002)
- Jong, A. Y., Chen, S. H., Stins, M. F., Kim, K. S., Tuan, T. L., and Huang, S. H.,**
Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells, *J.Med.Microbiol.*, **52** [Pt 8], 615-622 (2003).

- Jongbloed, J. D., Martin, U., Antelmann, H., Hecker, M., Tjalsma, H., Venema, G., Bron, S., van Dijl, J. M., and Muller, J.,**
TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway, *J.Biol.Chem.*, **275** [52], 41350-41357, (2000)
- Jonquieres, R., Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P., and Cossart, P.,**
Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria, *Mol.Microbiol.*, **34** [5], 902-914, (1999)
- Jonsson, K., Signas, C., Muller, H. P., and Lindberg, M.,**
Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene, *Eur.J.Biochem.*, **202** [3], 1041-1048 (1991).
- Jungblut, P. R., Schaible, U. E., Mollenkopf, H. J., Zimny-Arndt, U., Raupach, B., Mattow, J., Halada, P., Lamer, S., Hagens, K., and Kaufmann, S. H.,**
Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens, *Mol.Microbiol.*, **33** [6], 1103-1117 (1999).
- Karas, M. and Hillenkamp, F.,**
Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, *Anal.Chem.*, **60** [20], 2299-2301, (1988)
- Karin, M. and Ben Neriah, Y.,**
Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity, *Annu.Rev.Immunol.*, **18**, 621-663 (2000).
- Karin, M. and Lin, A.,**
NF-kappaB at the crossroads of life and death, *Nat.Immunol.*, **3** [3], 221-227 (2002).
- Karunasagar, I., Krohne, G., and Goebel, W.,**
Listeria ivanovii is capable of cell-to-cell spread involving actin polymerization, *Infect.Immun.*, **61** [1], 162-169, (1993)
- Kayal, S., Lilienbaum, A., Poyart, C., Memet, S., Israel, A., and Berche, P.,**
Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines, *Mol.Microbiol.*, **31** [6], 1709-1722 (1999).
- Kazmierczak, M. J., Mithoe, S. C., Boor, K. J., and Wiedmann, M.,**
Listeria monocytogenes sigma B regulates stress response and virulence functions, *J.Bacteriol.*, **185** [19], 5722-5734, (2003)
- Khyse-Andersen, J.,**
Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**. (1984)
- Kim, H. S., Nagalla, S. R., Oh, Y., Wilson, E., Roberts, C. T., Jr., and Rosenfeld, R. G.,**
Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **94** [24], 12981-12986, (1997)
- Klarsfeld, A. D., Goossens, P. L., and Cossart, P.,**
Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: *plcA*, *purH*, *purD*, *pyrE* and an arginine ABC transporter gene, *arpJ*, *Mol Microbiol*, **13** [4], 585-597, (1994)

- Klose, J.,**
Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals, *Humangenetik.*, **26** [3], 231-243, (1975)
- Klose, J.,**
Large-gel 2-D electrophoresis, *Methods Mol.Biol.*, **112**, 147-172, (1999)
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., and Cossart, P.,**
L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein, *Cell*, **68** [3], 521-531, (1992)
- Kocks, C., Hellio, R., Gounon, P., Ohayon, H., and Cossart, P.,**
Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly, *J.Cell Sci.*, **105 (Pt 3)**, 699-710, (1993)
- Kontinen, V. P., Saris, P., and Sarvas, M.,**
A gene (prsA) of *Bacillus subtilis* involved in a novel, late stage of protein export, *Mol.Microbiol.*, **5** [5], 1273-1283, (1991)
- Kontinen, V. P. and Sarvas, M.,**
The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high-level secretion, *Mol.Microbiol.*, **8** [4], 727-737, (1993)
- Koronakis, V. and Hughes, C.,**
Bacterial signal peptide-independent protein export: HlyB-directed secretion of hemolysin, *Semin.Cell Biol.*, **4** [1], 7-15, (1993)
- Kreikemeyer, B., Mclver, K. S., and Podbielski, A.,**
Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions, *Trends Microbiol*, **11** [5], 224-232 (2003).
- Ku, N. O., Azhar, S., and Omary, M. B.,**
Keratin 8 phosphorylation by p38 kinase regulates cellular keratin filament reorganization: modulation by a keratin 1-like disease causing mutation, *J.Biol.Chem.*, **277** [13], 10775-10782, (2002)
- Ku, N. O. and Omary, M. B.,**
Phosphorylation of human keratin 8 in vivo at conserved head domain serine 23 and at epidermal growth factor-stimulated tail domain serine 431, *J.Biol.Chem.*, **272** [11], 7556-7564, (1997)
- Kuhn, M. and Goebel, W.,**
Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells, *Infect.Immun.*, **57** [1], 55-61, (1989)
- Kuhn, M.,**
The microtubule depolymerizing drugs nocodazole and colchicine inhibit the uptake of *Listeria monocytogenes* by P388D1 macrophages, *FEMS Microbiol.Lett.*, **160** [1], 87-90 (1998).
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N. M., Choi, S. K., Codani, J. J., Connerton, I. F., Danchin, A., and .,**
The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, *Nature*, **390** [6657], 249-256, (1997)
- Kuntziger, T., Gavet, O., Manceau, V., Sobel, A., and Bornens, M.,**
Stathmin/Op18 phosphorylation is regulated by microtubule assembly, *Mol.Biol.Cell*, **12** [2], 437-448 (2001).

- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N. K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H., and Hiramatsu, K.,**
Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Lancet*, **357** [9264], 1225-1240, (2001)
- Laemmli, U. K.,**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227** [259], 680-685, (1970)
- Lampidis, R., Gross, R., Sokolovic, Z., Goebel, W., and Kreft, J.,**
The virulence regulator protein of *Listeria ivanovii* is highly homologous to PrfA from *Listeria monocytogenes* and both belong to the Crp-Fnr family of transcription regulators, *Mol.Microbiol.*, **13** [1], 141-151, (1994)
- Larsson, N., Marklund, U., Gradin, H. M., Brattsand, G., and Gullberg, M.,**
Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis, *Mol.Cell Biol.*, **17** [9], 5530-5539, (1997)
- Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J., and Cossart, P.,**
Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization, *Infect.Immun.*, **65** [12], 5309-5319, (1997)
- Lee, C. C. and Yamada, K. M.,**
Alternatively spliced juxtamembrane domain of a tyrosine kinase receptor is a multifunctional regulatory site. Deletion alters cellular tyrosine phosphorylation pattern and facilitates binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to the hepatocyte growth factor receptor, *J.Biol.Chem.*, **270** [2], 507-510 (1995).
- Lee, E. G., Boone, D. L., Chai, S., Libby, S. L., Chien, M., Lodolce, J. P., and Ma, A.,**
Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice, *Science*, **289** [5488], 2350-2354 (2000).
- Lee, Y. I., Kang-Park, S., Do, S. I., and Lee, Y. I.,**
The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade, *J.Biol.Chem.*, **276** [20], 16969-16977 (2001).
- Lei, B., Mackie, S., Lukomski, S., and Musser, J. M.,**
Identification and immunogenicity of group A *Streptococcus* culture supernatant proteins, *Infect.Immun.*, **68** [12], 6807-6818 (2000).
- Leimeister-Wachter, M., Haffner, C., Domann, E., Goebel, W., and Chakraborty, T.,**
Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **87** [21], 8336-8340 (1990).
- Leimeister-Wachter, M., Domann, E., and Chakraborty, T.,**
The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated, *J.Bacteriol.*, **174** [3], 947-952, (1992)
- Lenz, L. L. and Portnoy, D. A.,**
Identification of a second *Listeria* secA gene associated with protein secretion and the rough phenotype, *Mol.Microbiol.*, **45** [4], 1043-1056, (2002)
- Lenz, L. L., Mohammadi, S., Geissler, A., and Portnoy, D. A.,**
SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **100** [21], 12432-12437, (2003)

- Levens, D.,**
Disentangling the MYC web, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **99** [9], 5757-5759, (2002)
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C., and Altieri, D. C.,**
Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin, *Nature*, **396** [6711], 580-584 (1998).
- Li, H., Kolluri, S. K., Gu, J., Dawson, M. I., Cao, X., Hobbs, P. D., Lin, B., Chen, G., Lu, J., Lin, F., Xie, Z., Fontana, J. A., Reed, J. C., and Zhang, X.,**
Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3, *Science*, **289** [5482], 1159-1164, (2000)
- Liao, J., Ku, N. O., and Omary, M. B.,**
Two-dimensional gel analysis of glandular keratin intermediate filament phosphorylation, *Electrophoresis*, **17** [11], 1671-1676 (1996).
- Liao, J., Ku, N. O., and Omary, M. B.,**
Stress, apoptosis, and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at Ser-73 in tissues and cultured cells, *J.Biol.Chem.*, **272** [28], 17565-17573, (1997)
- Lin, B., Kolluri, S. K., Lin, F., Liu, W., Han, Y. H., Cao, X., Dawson, M. I., Reed, J. C., and Zhang, X. K.,**
Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3, *Cell*, **116** [4], 527-540, (2004)
- Lindquist, S. and Craig, E. A.,**
The heat-shock proteins, *Annu.Rev.Genet.*, **22**, 631-677, (1988)
- Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J., and Chakraborty, T.,**
Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms, *Infect.Immun.*, **63** [10], 3896-3903, (1995)
- Lirette, R. and Caradonna, S.,**
Inhibition of phosphorylation of cellular dUTP nucleotidohydrolase as a consequence of herpes simplex virus infection, *J.Cell Biochem.*, **43** [4], 339-353 (1990).
- Loisel, T. P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M. F.,**
Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins, *Nature*, **401** [6753], 613-616, (1999)
- Lovric, J., Dammeier, S., Kieser, A., Mischak, H., and Kolch, W.,**
Activated raf induces the hyperphosphorylation of stathmin and the reorganization of the microtubule network, *J.Biol.Chem.*, **273** [35], 22848-22855 (1998).
- Luo, X. N., Mookerjee, B., Ferrari, A., Mistry, S., and Atweh, G. F.,**
Regulation of phosphoprotein p18 in leukemic cells. Cell cycle regulated phosphorylation by p34cdc2 kinase, *J.Biol.Chem.*, **269** [14], 10312-10318 (1994).
- Machner, M.,**
Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Virulenzfaktoren ActA und Internalin B des humanpathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes*, *Dissertation*, Braunschweig (2002)
- Maguire, M., Coates, A. R., and Henderson, B.,**
Chaperonin 60 unfolds its secrets of cellular communication, *Cell Stress.Chaperones.*, **7** [4], 317-329 (2002).
- Mandal, M., Vadlamudi, R., Nguyen, D., Wang, R. A., Costa, L., Bagheri-Yarmand, R., Mendelsohn, J., and Kumar, R.,**
Growth factors regulate heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K expression and function, *J.Biol.Chem.*, **276** [13], 9699-9704 (2001).

- Mandelkow, E. and Mandelkow, E. M.,**
Kinesin motors and disease, *Trends Cell Biol.*, **12** [12], 585-591 (2002).
- Mansell, A., Braun, L., Cossart, P., and O'Neill, L. A.,**
A novel function of InlB from *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappaB in J774 macrophages, *Cell Microbiol.*, **2** [2], 127-136 (2000).
- Mansell, A., Khelef, N., Cossart, P., and O'Neill, L. A.,**
Internalin B activates nuclear factor-kappa B via Ras, phosphoinositide 3-kinase, and Akt, *J.Biol.Chem.*, **276** [47], 43597-43603 (2001).
- Marino, M., Banerjee, M., Jonquieres, R., Cossart, P., and Ghosh, P.,**
GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are SH3-like and mediate binding to host ligands, *EMBO J.*, **21** [21], 5623-5634 (2002).
- Marklund, U., Larsson, N., Gradin, H. M., Brattsand, G., and Gullberg, M.,**
Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics, *EMBO J.*, **15** [19], 5290-5298, (1996)
- Martin, K., Steinberg, T. H., Goodman, T., Schulenberg, B., Kilgore, J. A., Gee, K. R., Beechem, J. M., and Patton, W. F.,**
Strategies and solid-phase formats for the analysis of protein and peptide phosphorylation employing a novel fluorescent phosphorylation sensor dye, *Comb.Chem.High Throughput.Screen.*, **6** [4], 331-339, (2003)
- Matsuo, K., Owens, J. M., Tonko, M., Elliott, C., Chambers, T. J., and Wagner, E. F.,**
Fosl1 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation, *Nat.Genet.*, **24** [2], 184-187, (2000)
- Maucuer, A., Camonis, J. H., and Sobel, A.,**
Stathmin interaction with a putative kinase and coiled-coil-forming protein domains, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **92** [8], 3100-3104, (1995)
- Maucuer, A., Ozon, S., Manceau, V., Gavet, O., Lawler, S., Curmi, P., and Sobel, A.,**
KIS is a protein kinase with an RNA recognition motif, *J.Biol.Chem.*, **272** [37], 23151-23156 (1997).
- Mazmanian, S. K., Liu, G., Ton-That, H., and Schneewind, O.,**
Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall, *Science*, **285** [5428], 760-763, (1999)
- Mazmanian, S. K., Ton-That, H., Su, K., and Schneewind, O.,**
An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during *Staphylococcus aureus* pathogenesis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **99** [4], 2293-2298, (2002)
- McGee, K., Holmfeldt, P., and Fallman, M.,**
Microtubule-dependent regulation of Rho GTPases during internalisation of *Yersinia pseudotuberculosis*, *FEBS Lett.*, **533** [1-3], 35-41 (2003).
- Meima, R., and van Dijk, J.M.,**
Protein secretion in Gram-positive Bacteria, *Protein secretion pathways in Bacteria*, Hrsg. B. Oudega, Kluwer Academic Publisher, (2003)
- Melander, Gradin H., Marklund, U., Larsson, N., Chatila, T. A., and Gullberg, M.,**
Regulation of microtubule dynamics by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase IV/Gr-dependent phosphorylation of oncoprotein 18, *Mol.Cell Biol.*, **17** [6], 3459-3467, (1997)
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.-M., and Cossart, P.,**
E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells, *Cell*, **84** [6], 923-932, (1996)

- Mengaud, J., Vicente, M. F., and Cossart, P.,**
Transcriptional mapping and nucleotide sequence of the *Listeria monocytogenes* hlyA region reveal structural features that may be involved in regulation, *Infect.Immun.*, **57** [12], 3695-3701, (1989)
- Menne, K. M., Hermjakob, H., and Apweiler, R.,**
A comparison of signal sequence prediction methods using a test set of signal peptides, *Bioinformatics.*, **16** [8], 741-742, (2000)
- Merrick, J. C., Edelson, B. T., Bhardwaj, V., Swanson, P. E., and Unanue, E. R.,**
Lymphocyte apoptosis during early phase of *Listeria* infection in mice, *Am.J.Pathol.*, **151** [3], 785-792 (1997).
- Michel, E., Mengaud, J., Galsworthy, S., and Cossart, P.,**
Characterization of a large motility gene cluster containing the cheR, motAB genes of *Listeria monocytogenes* and evidence that PrfA downregulates motility genes, *FEMS Microbiol Lett.*, **169** [2], 341-347 (1998).
- Milohanic, E., Glaser, P., Coppee, J. Y., Frangeul, L., Vega, Y., Vazquez-Boland, J. A., Kunst, F., Cossart, P., and Buchrieser, C.,**
Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA, *Mol.Microbiol.*, **47** [6], 1613-1625, (2003)
- Mishu, B., Koehler, J., Lee, L. A., Rodrigue, D., Brenner, F. H., Blake, P., and Tauxe, R. V.,**
Outbreaks of *Salmonella enteritidis* infections in the United States, 1985-1991, *J.Infect.Dis.*, **169** [3], 547-552, (1994)
- Mistry, S. J., Li, H. C., and Atweh, G. F.,**
Role for protein phosphatases in the cell-cycle-regulated phosphorylation of stathmin, *Biochem.J.*, **334** (Pt 1), 23-29 (1998).
- Mistry, S. J. and Atweh, G. F.,**
Stathmin inhibition enhances okadaic acid-induced mitotic arrest: a potential role for stathmin in mitotic exit, *J.Biol.Chem.*, **276** [33], 31209-31215, (2001)
- Mistry, S. J. and Atweh, G. F.,**
Role of stathmin in the regulation of the mitotic spindle: potential applications in cancer therapy, *Mt.Sinai J.Med.*, **69** [5], 299-304 (2002).
- Modun, B. and Williams, P.,**
The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Infect.Immun.*, **67** [3], 1086-1092 (1999).
- Mootha, V. K., Bunkenborg, J., Olsen, J. V., Hjerrild, M., Wisniewski, J. R., Stahl, E., Bolouri, M. S., Ray, H. N., Sihag, S., Kamal, M., Patterson, N., Lander, E. S., and Mann, M.,**
Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria, *Cell*, **115** [5], 629-640 (2003).
- Mould, R. M., Shackleton, J. B., and Robinson, C.,**
Transport of proteins into chloroplasts. Requirements for the efficient import of two luminal oxygen-evolving complex proteins into isolated thylakoids, *J.Biol.Chem.*, **266** [26], 17286-17289, (1991)
- Mulder, N. J., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Barrell, D., Bateman, A., Binns, D., Biswas, M., Bradley, P., Bork, P., Bucher, P., Copley, R. R., Courcelle, E., Das, U., Durbin, R., Falquet, L., Fleischmann, W., Griffiths-Jones, S., Haft, D., Harte, N., Hulo, N., Kahn, D., Kanapin, A., Krestyaninova, M., Lopez, R., Letunic, I., Lonsdale, D., Silventoinen, V., Orchard, S. E., Pagni, M., Peyruc, D., Ponting, C. P., Selengut, J. D., Servant, F., Sigrist, C. J., Vaughan, R., and Zdobnov, E. M.,**
The InterPro Database, 2003 brings increased coverage and new features, *Nucleic Acids Res.*, **31** [1], 315-318 (2003).

- Muller, D. R., Schindler, P., Coulot, M., Voshol, H., and van Oostrum, J.,**
Mass spectrometric characterization of stathmin isoforms separated by 2D PAGE, *J.Mass Spectrom.*, **34** [4], 336-345, (1999)
- Muller, M., Morotti, A., and Ponzetto, C.,**
Activation of NF-kappaB is essential for hepatocyte growth factor-mediated proliferation and tubulogenesis, *Mol.Cell Biol.*, **22** [4], 1060-1072 (2002).
- Nadon, C. A., Bowen, B. M., Wiedmann, M., and Boor, K. J.,**
Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*, *Infect.Immun.*, **70** [7], 3948-3952, (2002)
- Navarre, W. W. and Schneewind, O.,**
Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope, *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, **63** [1], 174-229, (1999)
- Neugebauer, J. M.,**
Detergents: an overview, *Methods Enzymol.*, **182**, 239-253, (1990)
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W.,**
Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250, *Electrophoresis*, **9** [6], 255-262, (1988)
- Niebuhr, K., Chakraborty, T., Rohde, M., Gazlig, T., Jansen, B., Kollner, P., and Wehland, J.,**
Localization of the ActA polypeptide of *Listeria monocytogenes* in infected tissue culture cell lines: ActA is not associated with actin "comets", *Infect.Immun.*, **61** [7], 2793-2802, (1993)
- Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U. D., Walter, U., Gertler, F. B., Wehland, J., and Chakraborty, T.,**
A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family, *EMBO J.*, **16** [17], 5433-5444, (1997)
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G.,**
Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites, *Protein Eng*, **10** [1], 1-6, (1997)
- Nishizawa, M., Kataoka, K., Goto, N., Fujiwara, K. T., and Kawai, S.,**
v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **86** [20], 7711-7715, (1989)
- O'Farrell, P. H.,**
High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *J.Biol.Chem.*, **250** [10], 4007-4021, (1975)
- O'Riordan, M., Yi, C. H., Gonzales, R., Lee, K. D., and Portnoy, D. A.,**
Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **99** [21], 13861-13866 (2002).
- Oda, Y., Nagasu, T., and Chait, B. T.,**
Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome, *Nat.Biotechnol.*, **19** [4], 379-382 (2001).
- Odero-Marah, V. A., Khalkhali-Ellis, Z., Schneider, G. B., Seftor, E. A., Seftor, R. E., Koland, J. G., and Hendrix, M. J.,**
Tyrosine phosphorylation of maspin in normal mammary epithelia and breast cancer cells, *Biochem.Biophys.ResCommun*, **295** [4], 800-805 (2002).

- Okano, J., Shiota, G., Matsumoto, K., Yasui, S., Kurimasa, A., Hisatome, I., Steinberg, P., and Murawaki, Y.,**
Hepatocyte growth factor exerts a proliferative effect on oval cells through the PI3K/AKT signaling pathway, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **309** [2], 298-304 (2003).
- Okkels, L. M. and Andersen, P.,**
Protein-protein interactions of proteins from the ESAT-6 family of Mycobacterium tuberculosis, *J.Bacteriol.*, **186** [8], 2487-2491, (2004)
- Oliver, D. B. and Beckwith, J.,**
Identification of a new gene (secA) and gene product involved in the secretion of envelope proteins in Escherichia coli, *J.Bacteriol.*, **150** [2], 686-691, (1982)
- Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M.,**
Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics, *Mol.Cell Proteomics.*, **1** [5], 376-386, (2002)
- Onoda, K. and Yin, H. L.,**
gCap39 is phosphorylated. Stimulation by okadaic acid and preferential association with nuclei, *J.Biol.Chem.*, **268** [6], 4106-4112 (1993).
- Ostrowski, J., Van, Seuningen, I, Seger, R., Rauch, C. T., Sleath, P. R., McMullen, B. A., and Bomszyk, K.,**
Purification, cloning, and expression of a murine phosphoprotein that binds the kappa B motif in vitro identifies it as the homolog of the human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein. Description of a novel DNA-dependent phosphorylation process, *J.Biol.Chem.*, **269** [26], 17626-17634, (1994)
- Otsubo, K., Sakai, H., Murofushi, H., and Kuriyama, R.,**
Electrophoretic separation of tubulin alpha and beta subunits after S-sulfonation, *J.Biochem.(Tokyo)*, **77**, 17-21 (1975).
- Ozaki, M., Haga, S., Zhang, H. Q., Irani, K., and Suzuki, S.,**
Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in HGF-stimulated antiapoptotic signaling: role of PI3-K and Akt kinase upon rac1, *Cell Death.Differ.*, **10** [5], 508-515 (2003).
- Paik, S. H., Chakicherla, A., and Hansen, J. N.,**
Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by Bacillus subtilis 168, *J.Biol.Chem.*, **273** [36], 23134-23142, (1998)
- Pallen, M. J.,**
The ESAT-6/WXG100 superfamily -- and a new Gram-positive secretion system?, *Trends Microbiol*, **10** [5], 209-212, (2002)
- Pancholi, V. and Fischetti, V. A.,**
A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity, *J.Exp.Med.*, **176** [2], 415-426 (1992).
- Pancholi, V. and Fischetti, V. A.,**
alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci, *J.Biol.Chem.*, **273** [23], 14503-14515 (1998).
- Parida, S. K., Domann, E., Rohde, M., Muller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J., and Chakraborty, T.,**
Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of Listeria monocytogenes into human endothelial cells, *Mol.Microbiol.*, **28** [1], 81-93, (1998)
- Park, K. J., Gaynor, R. B., and Kwak, Y. T.,**
Heat shock protein 27 association with the I kappa B kinase complex regulates tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappa B activation, *J.Biol.Chem.*, **278** [37], 35272-35278, (2003)

- Parker, C. G., Hunt, J., Diener, K., McGinley, M., Soriano, B., Keesler, G. A., Bray, J., Yao, Z., Wang, X. S., Kohno, T., and Lichenstein, H. S.,**
Identification of stathmin as a novel substrate for p38 delta, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **249** [3], 791-796 (1998).
- Paterson, G. K. and Mitchell, T. J.,**
The biology of Gram-positive sortase enzymes, *Trends Microbiol.*, **12** [2], 89-95 (2004).
- Pearson, C. G. and Bloom, K.,**
Dynamic microtubules lead the way for spindle positioning, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **5** [6], 481-492 (2004).
- Peel, M., Donachie, W., and Shaw, A.,**
Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting, *J.Gen.Microbiol.*, **134 (Pt 8)**, 2171-2178 (1988).
- Pepinsky, R. B. and Sinclair, L. K.,**
Epidermal growth factor-dependent phosphorylation of lipocortin, *Nature*, **321** [6065], 81-84 (1986).
- Peri, S., Navarro, J. D., Amanchy, R., Kristiansen, T. Z., Jonnalagadda, C. K., Surendranath, V., Niranjana, V., Muthusamy, B., Gandhi, T. K., Gronborg, M., Ibarrola, N., Deshpande, N., Shanker, K., Shivashankar, H. N., Rashmi, B. P., Ramya, M. A., Zhao, Z., Chandrika, K. N., Padma, N., Harsha, H. C., Yatish, A. J., Kavitha, M. P., Menezes, M., Choudhury, D. R., Suresh, S., Ghosh, N., Saravana, R., Chandran, S., Krishna, S., Joy, M., Anand, S. K., Madavan, V., Joseph, A., Wong, G. W., Schiemann, W. P., Constantinescu, S. N., Huang, L., Khosravi-Far, R., Steen, H., Tewari, M., Ghaffari, S., Blobe, G. C., Dang, C. V., Garcia, J. G., Pevsner, J., Jensen, O. N., Roepstorff, P., Deshpande, K. S., Chinnaiyan, A. M., Hamosh, A., Chakravarti, A., and Pandey, A.,**
Development of human protein reference database as an initial platform for approaching systems biology in humans, *Genome Res.*, **13** [10], 2363-2371, (2003)
- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S.,**
Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data, *Electrophoresis*, **20** [18], 3551-3567, (1999)
- Petit-Glatron, M. F., Grajcar, L., Munz, A., and Chambert, R.,**
The contribution of the cell wall to a transmembrane calcium gradient could play a key role in *Bacillus subtilis* protein secretion, *Mol.Microbiol.*, **9** [5], 1097-1106, (1993)
- Pfeuffer, T., Goebel, W., Laubinger, J., Bachmann, M., and Kuhn, M.,**
LaXp180, a mammalian ActA-binding protein, identified with the yeast two-hybrid system, co-localizes with intracellular *Listeria monocytogenes*, *Cell Microbiol.*, **2** [2], 101-114, (2000)
- Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla, Zonca P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G., and Comoglio, P. M.,**
A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family, *Cell*, **77** [2], 261-271 (1994).
- Poyart, C., Abachin, E., Razafimanantsoa, I., and Berche, P.,**
The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C: direct evidence obtained by gene complementation, *Infect.Immun.*, **61** [4], 1576-1580 (1993).
- Premaratne, R. J., Lin, W. J., and Johnson, E. A.,**
Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*, *Appl.Environ.Microbiol.*, **57** [10], 3046-3048, (1991)

- Rabilloud, T., Strub, J. M., Lucie, S., van Dorsselaer, A., and Lunardi, J.,**
A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels, *Proteomics.*, **1** [5], 699-704, (2001)
- Raffelsbauer, D., Bubert, A., Engelbrecht, F., Scheinpflug, J., Simm, A., Hess, J., Kaufmann, S. H., and Goebel, W.,**
The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice, *Mol.Gen.Genet.*, **260** [2-3], 144-158 (1998).
- Rapoport, T. A., Jungnickel, B., and Kutay, U.,**
Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes, *Annu.Rev.Biochem.*, **65**, 271-303, (1996)
- Recio, J. A. and Merlino, G.,**
Hepatocyte growth factor/scatter factor induces feedback up-regulation of CD44v6 in melanoma cells through Egr-1, *Cancer Res.*, **63** [7], 1576-1582 (2003).
- Reglier-Poupet, H., Frehel, C., Dubail, I., Beretti, J. L., Berche, P., Charbit, A., and Raynaud, C.,**
Maturation of lipoproteins by type II signal peptidase is required for phagosomal escape of *Listeria monocytogenes*, *J.Biol.Chem.*, **278** [49], 49469-49477, (2003a)
- Reglier-Poupet, H., Pellegrini, E., Charbit, A., and Berche, P.,**
Identification of LpeA, a PsaA-like membrane protein that promotes cell entry by *Listeria monocytogenes*, *Infect.Immun.*, **71** [1], 474-482 (2003b).
- Ripio, M. T., Dominguez-Bernal, G., Suarez, M., Brehm, K., Berche, P., and Vazquez-Boland, J. A.,**
Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition, *Res.Microbiol.*, **147** [5], 371-384, (1996)
- Robbins, J. R., Barth, A. I., Marquis, H., de Hostos, E. L., Nelson, W. J., and Theriot, J. A.,**
Listeria monocytogenes exploits normal host cell processes to spread from cell to cell, *J.Cell Biol.*, **146** [6], 1333-1350, (1999)
- Robinson, C., Cai, D., Hulford, A., Brock, I. W., Michl, D., Hazell, L., Schmidt, I., Herrmann, R. G., and Klosgen, R. B.,**
The presequence of a chimeric construct dictates which of two mechanisms are utilized for translocation across the thylakoid membrane: evidence for the existence of two distinct translocation systems, *EMBO J.*, **13** [2], 279-285, (1994)
- Robinson, R. C., Turbedsky, K., Kaiser, D. A., Marchand, J. B., Higgs, H. N., Choe, S., and Pollard, T. D.,**
Crystal structure of Arp2/3 complex, *Science*, **294** [5547], 1679-1684, (2001)
- Rogers, H. W., Callery, M. P., Deck, B., and Unanue, E. R.,**
Listeria monocytogenes induces apoptosis of infected hepatocytes, *J.Immunol.*, **156** [2], 679-684 (1996).
- Rosenkrands, I., Weldingh, K., Jacobsen, S., Hansen, C. V., Florio, W., Gianetri, I., and Andersen, P.,**
Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection, *Electrophoresis*, **21** [5], 935-948 (2000).
- Rossi, J., Bischoff, M., Wada, A., and Berger-Bachi, B.,**
MsrR, a putative cell envelope-associated element involved in *Staphylococcus aureus* *sarA* attenuation, *Antimicrob.Agents Chemother.*, **47** [8], 2558-2564 (2003).

- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., and Chait, B. T.,**
The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism, *J.Cell Biol.*, **148** [4], 635-651, (2000)
- Royal, I., Lamarche-Vane, N., Lamorte, L., Kaibuchi, K., and Park, M.,**
Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation, *Mol.Biol.Cell*, **11** [5], 1709-1725 (2000).
- Sadaie, Y., Takamatsu, H., Nakamura, K., and Yamane, K.,**
Sequencing reveals similarity of the wild-type div+ gene of *Bacillus subtilis* to the *Escherichia coli* secA gene, *Gene*, **98** [1], 101-105, (1991)
- Samad, T. A., Moore, K. A., Sapirstein, A., Billet, S., Allchorne, A., Poole, S., Bonventre, J. V., and Woolf, C. J.,**
Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity, *Nature*, **410** [6827], 471-475, (2001)
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.,**
Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Press, USA*, (1989)
- Schaumburg, J.,**
Identifizierung und Charakterisierung von Oberflächenproteinen des Gram-positiven Bakteriums *Listeria monocytogenes*, *Dissertation*, Braunschweig, (2004)
- Schaumburg, J., Diekmann, O., Hagendorff, P., Bergmann, S., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Jansch, L., Wehland, J., and Karst, U.,**
The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*, *Proteomics*, **10** [4], (2004) *in press*
- Schiebel, E., Driessen, A. J., Hartl, F. U., and Wickner, W.,**
Delta mu H+ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase, *Cell*, **64** [5], 927-939, (1991)
- Schirmer, E. C., Florens, L., Guan, T., Yates, J. R., III, and Gerace, L.,**
Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics, *Science*, **301** [5638], 1380-1382 (2003).
- Schlaepfer, D. D., Hauck, C. R., and Sieg, D. J.,**
Signaling through focal adhesion kinase, *Prog.Biophys.Mol.Biol.*, **71** [3-4], 435-478, (1999)
- Schubert, W. D., Gobel, G., Diepholz, M., Darji, A., Kloer, D., Hain, T., Chakraborty, T., Wehland, J., Domann, E., and Heinz, D. W.,**
Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* combine three distinct folds into a contiguous internalin domain, *J Mol Biol*, **312** [4], 783-94, (2001)
- Schulze-Bergkamen, H., Brenner, D., Krueger, A., Suess, D., Fas, S. C., Frey, C. R., Dax, A., Zink, D., Buchler, P., Muller, M., and Krammer, P. H.,**
Hepatocyte growth factor induces Mcl-1 in primary human hepatocytes and inhibits CD95-mediated apoptosis via Akt, *Hepatology*, **39** [3], 645-654 (2004).
- Sha, J., Galindo, C. L., Pancholi, V., Popov, V. L., Zhao, Y., Houston, C. W., and Chopra, A. K.,**
Differential expression of the enolase gene under in vivo versus in vitro growth conditions of *Aeromonas hydrophila*, *Microb.Pathog.*, **34** [4], 195-204 (2003).
- Sheehan, B., Klarsfeld, A., Msadek, T., and Cossart, P.,**
Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator, *J.Bacteriol.*, **177** [22], 6469-6476, (1995)
- Sheehan, B., Klarsfeld, A., Ebright, R., and Cossart, P.,**
A single substitution in the putative helix-turn-helix motif of the pleiotropic activator PrfA attenuates *Listeria monocytogenes* virulence, *Mol.Microbiol.*, **20** [4], 785-797, (1996)

- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., and Ireton, K.,**
InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase, *Cell*, **103** [3], 501-510, (2000)
- Shevchenko, A., Chernushevich, I., Wilm, M., and Mann, M.,**
De Novo peptide sequencing by nanoelectrospray tandem mass spectrometry using triple quadrupole and quadrupole/time-of-flight instruments, *Methods Mol.Biol.*, **146**, 1-16, (2000)
- Shifrin, Y., Kirschner, J., Geiger, B., and Rosenshine, I.,**
Enteropathogenic *Escherichia coli* induces modification of the focal adhesions of infected host cells, *Cell Microbiol.*, **4** [4], 235-243 (2002).
- Shirane, M. and Nakayama, K. I.,**
Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis, *Nat.Cell Biol.*, **5** [1], 28-37, (2003)
- Sjodahl, J.,**
Repetitive sequences in protein A from *Staphylococcus aureus*. Arrangement of five regions within the protein, four being highly homologous and Fc-binding, *Eur.J.Biochem.*, **73** [2], 343-351 (1977).
- Sjoquist, J., Movitz, J., Johansson, I. B., and Hjelm, H.,**
Localization of protein A in the bacteria, *Eur.J.Biochem.*, **30** [1], 190-194 (1972).
- Skjot, R. L., Oettinger, T., Rosenkrands, I., Ravn, P., Brock, I., Jacobsen, S., and Andersen, P.,**
Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens, *Infect.Immun.*, **68** [1], 214-220, (2000)
- Smith, G. A., Portnoy, D. A., and Theriot, J. A.,**
Asymmetric distribution of the *Listeria monocytogenes* ActA protein is required and sufficient to direct actin-based motility, *Mol.Microbiol.*, **17** [5], 945-951, (1995)
- Sobel, A.,**
Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction?, *Trends Biochem.Sci.*, **16** [8], 301-305, (1991)
- Sokolovic, Z., Riedel, J., Wuenscher, M., and Goebel, W.,**
Surface-associated, PrfA-regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions, *Mol.Microbiol.*, **8** [2], 219-227 (1993).
- Sorensen, K. I. and Hove-Jensen, B.,**
Ribose catabolism of *Escherichia coli*: characterization of the rpiB gene encoding ribose phosphate isomerase B and of the rpiR gene, which is involved in regulation of rpiB expression, *J.Bacteriol.*, **178** [4], 1003-1011 (1996).
- Stradal, T. E., Rottner, K., Disanza, A., Confalonieri, S., Innocenti, M., and Scita, G.,**
Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins, *Trends Cell Biol.*, **14** [6], 303-311, (2004)
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., and Holle, A.,**
A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics, *Anal.Bioanal.Chem.*, **376** [7], 952-965, (2003)
- Takahashi, A., Kawasaki, T., Wong, H. L., Suharsono, U., Hirano, H., and Shimamoto, K.,**
Hyperphosphorylation of a mitochondrial protein, prohibitin, is induced by calyculin A in a rice lesion-mimic mutant *cdr1*, *Plant Physiol.*, **132** [4], 1861-1869 (2003).

- Takamatsu, H., Fuma, S., Nakamura, K., Sadaie, Y., Shinkai, A., Matsuyama, S., Mizushima, S., and Yamane, K.,**
In vivo and in vitro characterization of the secA gene product of *Bacillus subtilis*, *J.Bacteriol.*, **174** [13], 4308-4316, (1992)
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., and Yoshida, T.,**
Protein and Polymer Analyses up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **2** [8], 151-153, (1988)
- Taylor, S. W., Fahy, E., Zhang, B., Glenn, G. M., Warnock, D. E., Wiley, S., Murphy, A. N., Gaucher, S. P., Capaldi, R. A., Gibson, B. W., and Ghosh, S. S.,**
Characterization of the human heart mitochondrial proteome, *Nat.Biotechnol.*, **21** [3], 281-286 (2003).
- Tettelin, H., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Read, T. D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R. T., Haft, D. H., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Gwinn, M., Kolonay, J. F., Nelson, W. C., Peterson, J. D., Umayam, L. A., White, O., Salzberg, S. L., Lewis, M. R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A. M., Utterback, T. R., Hansen, C. L., McDonald, L. A., Feldblyum, T. V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E. K., Holt, I. E., Loftus, B. J., Yang, F., Smith, H. O., Venter, J. C., Dougherty, B. A., Morrison, D. A., Hollingshead, S. K., and Fraser, C. M.,**
Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*, *Science*, **293** [5529], 498-506, (2001)
- Throup, J. P., Koretke, K. K., Bryant, A. P., Ingraham, K. A., Chalker, A. F., Ge, Y., Marra, A., Wallis, N. G., Brown, J. R., Holmes, D. J., Rosenberg, M., and Burnham, M. K.,**
A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*, *Mol Microbiol*, **35** [3], 566-576 (2000).
- Tilney, L. G. and Portnoy, D. A.,**
Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*, *J.Cell Biol.*, **109** [4 Pt 1], 1597-1608, (1989)
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S., and van Dijl, J. M.,**
Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome, *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, **64** [3], 515-547, (2000)
- Toivola, D. M., Zhou, Q., English, L. S., and Omary, M. B.,**
Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells, *Mol.Biol.Cell*, **13** [6], 1857-1870 (2002).
- Tokunaga, M., Loranger, J. M., Chang, S. Y., Regue, M., Chang, S., and Wu, H. C.,**
Identification of prolipoprotein signal peptidase and genomic organization of the *lsp* gene in *Escherichia coli*, *J.Biol.Chem.*, **260** [9], 5610-5615, (1985)
- Toutou, R., Richardson, J., Bose, S., Nakanishi, M., Rivett, J., and Allday, M. J.,**
A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome, *EMBO J.*, **20** [10], 2367-2375, (2001)
- Tsuji, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., and DuBois, R. N.,**
Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells, *Cell*, **93** [5], 705-716, (1998)
- Ueda, H., Abbi, S., Zheng, C., and Guan, J. L.,**
Suppression of Pyk2 kinase and cellular activities by FIP200, *J.Cell Biol.*, **149** [2], 423-430, (2000)

- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., and Rothberg, J. M.,
A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nature*, **403** [6770], 623-627, (2000)
- van der, Wolk J., Klose, M., Breukink, E., Demel, R. A., de Kruijff, B., Freudl, R., and Driessen, A. J.,
Characterization of a *Bacillus subtilis* SecA mutant protein deficient in translocation ATPase and release from the membrane, *Mol.Microbiol.*, **8** [1], 31-42, (1993)
- van der Wolk, J. P., Klose, M., de Wit, J. G., den Blaauwen, T., Freudl, R., and Driessen, A. J.,
Identification of the magnesium-binding domain of the high-affinity ATP-binding site of the *Bacillus subtilis* and *E. coli* SecA protein, *J.Biol.Chem.*, **270** [32], 18975-18982, (1995)
- van Wely, K. H., Swaving, J., Freudl, R., and Driessen, A. J.,
Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria, *FEMS Microbiol.Rev.*, **25** [4], 437-454, (2001)
- Vazquez-Boland, J. A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud, J., and Cossart, P.,
Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread, *Infect.Immun.*, **60** [1], 219-230, (1992)
- Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J.,
Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants, *Clin.Microbiol.Rev.*, **14** [3], 584-640, (2001)
- Venkataraman, C., Gao, L. Y., Bondada, S., and Kwaik, Y. A.,
Identification of putative cytoskeletal protein homologues in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* as substrates for induced tyrosine phosphatase activity upon attachment to the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, *J.Exp.Med.*, **188** [3], 505-514 (1998).
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanagan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di, Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M. L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferreira, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratt, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y. H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N. N., Tse, S., Vech,

- C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J. F., Guigo, R., Campbell, M. J., Sjolander, K. V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yoosheph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y. H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., and Nodell, M.,
The sequence of the human genome, *Science*, **291** [5507], 1304-1351 (2001).
- Wahl, C., Maier, S., Marre, R., and Essig, A.,**
Chlamydia pneumoniae induces the expression of inhibitor of apoptosis 2 (c-IAP2) in a human monocytic cell line by an NF-kappaB-dependent pathway, *Int.J.Med.Microbiol.*, **293** [5], 377-381 (2003).
- Wang, Z. Q., Ovitt, C., Grigoriadis, A. E., Mohle-Steinlein, U., Ruther, U., and Wagner, E. F.,**
Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos, *Nature*, **360** [6406], 741-745, (1992)
- Washburn, M. P., Wolters, D., and Yates, J. R., III,**
Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology, *Nat.Biotechnol.*, **19** [3], 242-247, (2001)
- Watarai, M., Funato, S., and Sasakawa, C.,**
Interaction of Ipa proteins of Shigella flexneri with alpha5beta1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells, *J.Exp.Med.*, **183** [3], 991-999 (1996).
- Waterman-Storer, C. M., Worthylake, R. A., Liu, B. P., Burridge, K., and Salmon, E. D.,**
Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts, *Nat.Cell Biol.*, **1** [1], 45-50 (1999).
- Weidner, K. M., Di Cesare, S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J., and Birchmeier, W.,**
Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis, *Nature*, **384** [6605], 173-176 (1996).
- Welch, M. D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. A., and Mitchison, T. J.,**
Interaction of human Arp2/3 complex and the Listeria monocytogenes ActA protein in actin filament nucleation, *Science*, **281** [5373], 105-108, (1998)
- Wittmann, T. and Waterman-Storer, C. M.,**
Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way?, *J.Cell Sci.*, **114** [Pt 21], 3795-3803 (2001).
- Wittmann, T., Bokoch, G. M., and Waterman-Storer, C. M.,**
Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1, *J.Cell Biol.*, **161** [5], 845-851 (2003).
- Wittmann, T., Bokoch, G. M., and Waterman-Storer, C. M.,**
Regulation of microtubule destabilizing activity of Op18/stathmin downstream of Rac1, *J.Biol.Chem.*, **279** [7], 6196-6203, (2004)
- Wood, Z. A., Schroder, E., Robin, Harris J., and Poole, L. B.,**
Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins, *Trends Biochem.Sci.*, **28** [1], 32-40 (2003).
- Wu, M. X., Ao, Z., Prasad, K. V., Wu, R., and Schlossman, S. F.,**
IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival, *Science*, **281** [5379], 998-1001, (1998)

- Xiao, G. H., Jeffers, M., Bellacosa, A., Mitsuuchi, Y., Vande Woude, G. F., and Testa, J. R.,**
Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **98** [1], 247-252 (2001).
- Xu, L., Yang, L., Moitra, P. K., Hashimoto, K., Rallabhandi, P., Kaul, S., Meroni, G., Jensen, J. P., Weissman, A. M., and D'Arpa, P.,**
BTBD1 and BTBD2 colocalize to cytoplasmic bodies with the RBCC/tripartite motif protein, TRIM5delta, *Exp.Cell Res.*, **288** [1], 84-93, (2003)
- Yamashita, H., Nakamura, K., Arai, H., Furumoto, H., Fujimoto, M., Kashiwagi, S., and Morimatsu, M.,**
Electrophoretic studies on the phosphorylation of stathmin and mitogen-activated protein kinases in neuronal cell death induced by oxidized very-low-density lipoprotein with apolipoprotein E, *Electrophoresis*, **23** [7-8], 998-1004 (2002).
- Yanai, A., Hirata, Y., Mitsuno, Y., Maeda, S., Shibata, W., Akanuma, M., Yoshida, H., Kawabe, T., and Omata, M.,**
Helicobacter pylori induces antiapoptosis through nuclear factor-kappaB activation, *J.Infect.Dis.*, **188** [11], 1741-1751 (2003).
- Yao, P., Zhan, Y., Xu, W., Li, C., Yue, P., Xu, C., Hu, D., Qu, C., and Yang, X.,**
Hepatocyte growth factor-induced proliferation of hepatic stem-like cells depends on activation of NF-kappaB, *J.Hepatol.*, **40** [3], 391-398 (2004).
- Yoshida, S. and Sasakawa, C.,**
Exploiting host microtubule dynamics: a new aspect of bacterial invasion, *Trends Microbiol.*, **11** [3], 139-143 (2003).
- Zhang, J., Zhang, D., McQuade, J. S., Behbehani, M., Tsien, J. Z., and Xu, M.,**
c-fos regulates neuronal excitability and survival, *Nat.Genet.*, **30** [4], 416-420, (2002)
- Zheng, G., Yan, L. Z., Vederas, J. C., and Zuber, P.,**
Genes of the *sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilisin, *J.Bacteriol.*, **181** [23], 7346-7355, (1999)
- Zhou, H., Watts, J. D., and Aebersold, R.,**
A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation, *Nat.Biotechnol.*, **19** [4], 375-378 (2001).
- Ziebandt, A. K., Weber, H., Rudolph, J., Schmid, R., Hoper, D., Engelmann, S., and Hecker, M.,**
Extracellular proteins of *Staphylococcus aureus* and the role of SarA and sigma B, *Proteomics.*, **1** [4], 480-493 (2001).

Webseitenreferenzen

http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.01	Centre for biological sequence analysis, SignalP
http://smart.embl-heidelberg.de/	SMART, European Molecular Biology Laboratory
http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html	Sosui Homepage
http://psort.nibb.ac.jp/	PSORT WWW Server
ftp://ftp.ibcp.fr/pub/ANTHEPROT/WINDOWS	Software ANalyseThePROtein
http://bioinfo.si.hirosaki-u.ac.jp/~TMPinGS/	Dataset of predicted transmembrane topologies in prokaryotic genomes (Arai et al., 2003)
http://genolist.pasteur.fr/ListiList/	<i>Listeria</i> Webserver, Europäisches <i>Listeria</i> Konsortium
http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html	KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/	Interpro, European Bioinformatic Institute
http://leger.gbf.de/	LEGER Proteomdatenbank, GBF
http://igweb.integratedgenomics.com/GOLD/	Genomes online database, GOLD
http://www.kfa-juelich.de/ibt/protsec/grundlagen.html	Homepage der Gruppe Prof. Freudl, Forschungszentrum Jülich, Grundlagen der Proteinsekretion
http://www.hprd.org/	Human Protein Reference Database
http://www.affymetrix.com	Affymetrix Homepage
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/	OMIM-Datenbank der NCBI

7. DANKSAGUNG

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Jürgen Wehland für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in der Zellbiologie durchführen zu können und das interessante Thema dieser Arbeit bedanken.

Des weiteren bedanke ich mich bei Lothar Jänsch für die fachliche Unterstützung und den freundschaftlichen Umgang.

Dank auch meinen KollegInnen aus der Proteomgruppe Maja Baumgärtner, Jessica Schaumburg und Kathrin Thedieck sowie Dirk Wehmhöner, Sandra Pilawa, Joseph Wissing und Jennifer Ehe.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Uwe Kärst für die freundliche Unterstützung bei der Arbeit und der Sekretionsvorhersage sowie Guido Dieterich für die Bioinformatischen Tools.

Besonderer Dank gilt der Unterstützung durch Reiner Munder und Kirsten Minkhart sowie der Massenspektrometrieabteilung insbesondere Jacky Majewski, Andrea Abrahamik und Manfred Nimtz.

Sehr hilfsbereit waren Tobias Reinl, Roman Fischer und Elmar Fischer, die mir einiges einfacher machten.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Leuten der Zellbiologie, darunter Brigitte Denker, Marlies Konradt, Amanda Mühlmann, Christian Erck, Anke Fabian, Julia Ehinger, Annika Steffen und Andrea Jenzora sowie Klemens Rottner und Petra Hagendorff, die mich viel unterstützten.

Thres Stradal gilt mein besonderer Dank für ihre immerwährende Unterstützung, Diskussionsbereitschaft, Motivation und gemeinsame "Tschiggen".

Bei Hartmut Niemann bedanke ich mich herzlich für das Bereitstellen von aufgereinigtem InlB-Protein.

Helénè Bierne danke ich für die Möglichkeit der Kooperation mit den Sortasen und die Bereitstellung der Stämme.

Bei Christoph Hauck bedanke ich mich für die Bereitstellung des FAK-GFP-Plasmids. Victor Wray danke ich herzlich für das hervorragende Korrigieren des Sekretom-Artikels.

Bei Tanja Töpfer und Robert Geffers bedanke ich mich herzlich für die RNA-Aufarbeitung und die Transkriptomuntersuchungen.

Prof. Dieter Jahn danke ich für die Übernahme des Co-Referats. Ihm und seiner Gruppe danke ich für die fruchtbaren Kooperationen.

Meinen Eltern, meinen Geschwistern und Freunden danke ich für die Unterstützung auch in schwierigen Zeiten.

Katha danke ich für die Korrekturen, dafür, dass sie mich nach Braunschweig verschleppte und dafür, dass sie immer für mich da war.

8. ANHANG

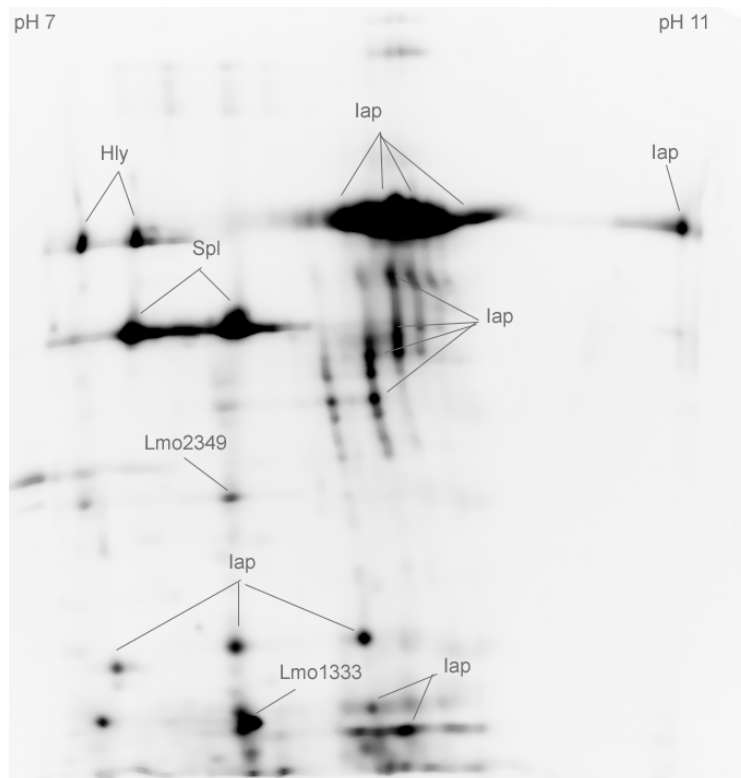


Abb. 8.1: 2D-Gel der Überstandsproteine von *L. monocytogenes* EGD-e wt (pH 7-11). Überstandsproteine wurden durch TCA gefällt und mittels 2D-PAGE im Bereich pH 7-11 aufgetrennt. Nach Färbung durch RuBPS wurden ausgewählte Proteine durch MALDI-TOF MS identifiziert.

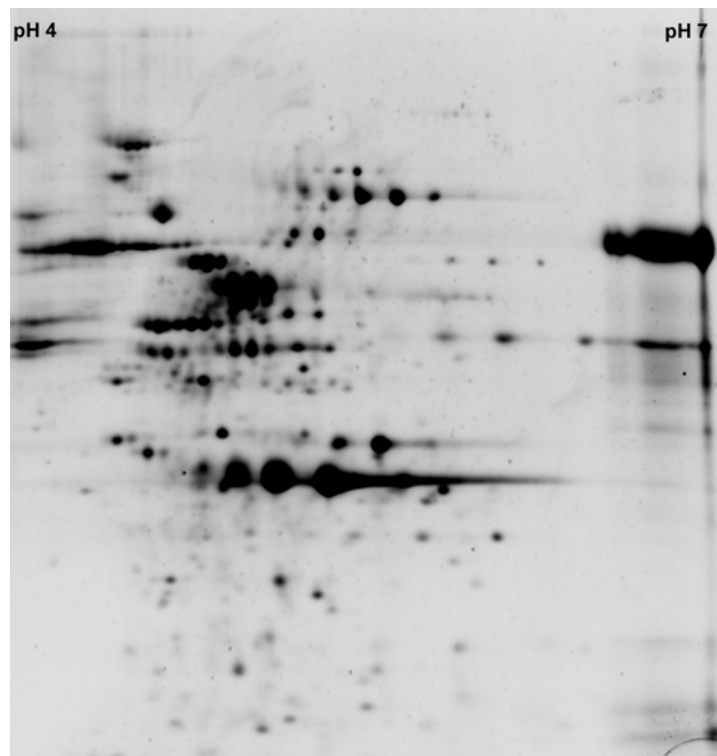


Abb. 8.2: 2D-Gel der Überstandsproteine von *L. monocytogenes* $\Delta prfA$. Überstandsproteine wurden durch TCA gefällt und mittels 2D-PAGE im Bereich pH 4-7 aufgetrennt. Färbung durch RuBPS.

Tabelle 8.1: Identifizierte Proteine im Kulturüberstand von *L. innocua*

Name	Funktion/Ähnlichkeit	Ortholog	Ortholog Identifiziert
Zelloberflächenproteine und Metabolismus der Zellwand			
Lin0141	Unknown (LPXTG motif)	Lmo0842	Nein
Lin0176	Autolysin	Lmo0129	Ja
Lin0177	5'-nucleotidase (LPXTG motif)	Lmo0130	Nein
Lin0461	Penicillin-binding protein (D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase)	Lmo0441	Nein
lap	P60 extracellular protein, invasion associated protein lap	lap	Ja
Lin0636	Adhesin (LPXTG motif)	Lmo0627	Nein
Lin0661	Internalin like protein (LPXTG motif)	Kein Ortho	Nein
Lin1064	Autolysin (GW motif)	Kein Ortho	Nein
Lin1179	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (GW motif)	Lmo1216	Ja
Lin1328	Internalin like protein (LPXTG motif)	Lmo1289	Nein
Lin1556	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (GW motif)	Lmo1521	Ja
Lin2055	Unknown, LysM domain	Lmo1941	Nein
Lin2289	NEAr Transporter	Lmo2185	Ja
Lin2290	NEAr Transporter	Lmo2186	Ja
Lin2647	Peptidase M23/M37	Lmo2504	Ja
Spl	Peptidoglycan lytic protein P45	Spl	Ja
Lin2666	Unknown, LysM domain	Lmo2522	Ja
Ami	Autolysin	Ami	Ja
Lin2838	Autolysin	Lmo2691	Ja
Lin2862	Unknown (LPXTG motif)	Lmo2714	Ja
Transporter, Lipoproteine und Energiestoffwechsel			
QoxA	AA3-600 quinol oxidase subunit II	QoxA	Ja
Lin0143	PTS system mannose-specific, factor IIAB	Lmo0096	Nein
Lin0182	Oligopeptide ABC transporter (binding protein)	Lmo0135	Ja
Lin0190	Oligopeptide ABC transporter (binding protein)	Lmo0152	Ja
Lin0191	High-affinity zinc ABC transporter (Zn(II)-binding lipoprotein)	Lmo0153	Ja
Lin0307	ABC transporters (ATP-binding protein)	Kein Ortho	Nein
PtsH	PTS phosphocarrier protein Hpr (histidine containing protein)	PtsH	Ja
Lin1002	Phosphotransferase system enzyme I	Lmo1003	No
TrxA	Thioredoxin	TrxA	Nein
TcsA	CD4+ T cell-stimulating antigen, lipoprotein	TcsA	Ja
Lin1849	Amino acid ABC transporter (binding protein)	Lmo1738	Ja
Lin2300	Pheromone ABC transporter (binding protein)	Lmo2196	Ja
Lin2447	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	Lmo2353	Nein
Lin2472	Phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIB component	Lmo2373	Nein
Lin2525	Ferrichrome ABC transporter fhuD (ferrichrome-binding protein)	Lmo2431	Nein
Zellteilung und Flagellen			
Lin0236	SpoVG protein	Lmo0197	Nein
FlaA	Flagellin protein	FlaA	Nein
Lin0707	Flagellar switch protein FlIM	Lmo0699	Nein
Lin0714	Flagellar hook-associated protein 3 FlgL	Lmo0706	Nein
FtsZ	Cell-division initiation protein Fts	FtsZ	Nein
Entgiftung und Adaption an untypische Bedingungen			
Lin0927	Sulfatase/Phosphatase	Lmo0927	Ja
Fri	Non-heme iron-binding ferritin	Fri	Ja
Lin1103	Clp protease	Lmo1138	Nein
Sod	Superoxide dismutase	Sod	Ja
Kat	Catalase	Kat	Ja
Chaperone			
DnaK	Heat-shock protein DnaK	DnaK	Ja
GroEL	Heat-shock protein GroEL	GroEL	Ja
GroES	Heat-shock protein GroES	GroES	Ja
Regulation und Sensing			
Lin0031	Xylose repressor	Lmo0032	Nein
Lin1622	Transcriptional regulator, MerR family	Kein Ortho	Nein
Lin1807	Methyl-accepting chemotaxis proteins	Lmo1699	Nein
Lin2662	Transcriptional regulator, LytR family	Lmo2518	Ja

Proteinsynthese (Elongation)

RplL	Ribosomal protein L12	RplL	Ja
Lin0987	Peptide chain release factor 3 (RF-3)	Lmo0988	Nein
Tsf	Translation elongation factor	Tsf	Ja
Lin2052	Ribosomal protein S1 like protein	Lmo1938	Nein
TufA	Translation elongation factor EF-Tu	TufA	Ja

DNA-bindende Proteine

Hup	Non-specific DNA-binding protein HU	Hup	Ja
-----	-------------------------------------	-----	----

Kohlenhydratmetabolismus

Ldh	L-lactate dehydrogenase	Lsh	Nein
Lin0449	Sugar hydrolase	Lmo0429	Nein
PdhD	Dihydrolipoamide dehydrogenase, E3 subunit of pyruvate dehydrogenase complex	PdhD	Nein
Lin1413	6-phosphogluconate dehydrogenase	Lmo1376	Nein
PykA	Pyruvate kinases	PykA	Nein
Lin1606	Phosphofructokinase	Lmo1571	Ja
Lin2355	Phosphoglucomutase	Lmo2253	Nein
Pgi	Glucose-6-phosphate isomerase	Pgi	Nein
Eno	Enolase	Eno	Ja
Tpi	Triose phosphate isomerase	Tpi	Nein
Pgk	Phosphoglycerate kinase	Pgk	Ja
Gap	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Gap	Ja
FbaA	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase type II	FbaA	Nein

Aminosäuremetabolismus

CysK	Cysteine synthase	CysK	Ja
Lin0263	Arginine kinase	Lm0231	Nein
GlnA	Glutamine synthetases	GlnA	Nein
Lin1552	Nitrogen regulatory PII protein	Lmo1517	Nein
GlyA	Glycine hydroxymethyltransferase	ClyA	Ja

Nukleotid- und Nukleinsäurenmetabolismus

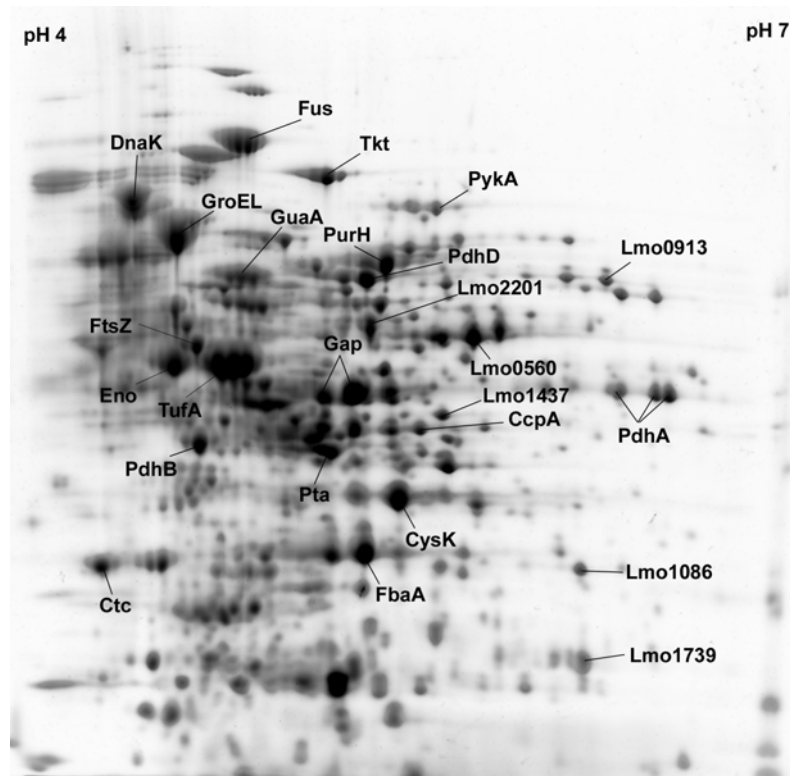
Prs	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase	Prs	Nein
-----	---	-----	------

Unbekannt

LmaA	Unknown	LmaA	Ja
Lin0166	Unknown	Lmo0119	Ja
Lin0173	Unknown, similar to B. subtilis YabE protein	Lmo0126	Nein
Lin0225	Unknown, similar to B. subtilis Yycl protein	Lmo0186	Nein
Lin0318	Unknown, conserved hypothetical protein	Lmo0290	Nein
Lin0567	Unknown	Lmo0558	Nein
Lin0683	Unknown	Lmo0675	Nein
Lin0784	unknown, similar to membrane proteins	Lmo0791	Nein
Lin0908	unknown	Lmo0908	Nein
Lin1056	unknown	Lmo1068	Ja
Lin1090	unknown	Kein Ortho	Nein
Lin1210	unknown, similar to B. subtilis YneA protein	Kein Ortho	Nein
Lin1341	unknown, similar to B. subtilis YqzC protein	Lmo1303	Ja
Lin1370	Unknown	Lmo1333	Ja
Lin1864	unknown	Lmo1752	Nein
Lin2185	Unknown	Lmo2079	Ja

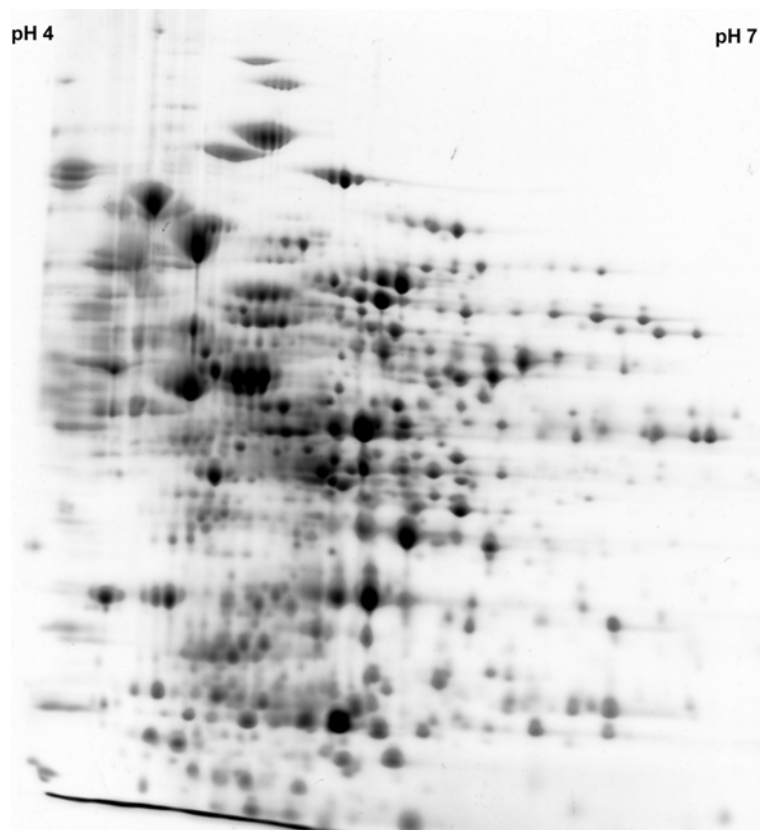
Phagenproteine

Lin0174	Gp20 from Bacteriophage A118	Lmo0127	Nein
Lin2576	Capsid protein [Bacteriophage bIL285]	Kein Ortho	Nein

**Abb. 8.3:**

2D-Gel der cytosolischen Proteine von *L. monocytogenes* EGD-e wt.

Die Zellen wurden durch eine French Press aufgeschlossen. Die Proteine wurden durch TCA gefällt und mittels 2D-PAGE im Bereich pH 4-7 aufgetrennt. Nach Färbung durch RuBPS wurden ausgewählte Proteine durch MALDI-TOF MS identifiziert.

**Abb. 8.4:**

2D-Gel der cytosolischen Proteine von *L. monocytogenes* $\Delta prfA$.

Die Zellen wurden durch eine French Press aufgeschlossen. Die Proteine wurden durch TCA gefällt, mittels 2D-PAGE im Bereich pH 4-7 aufgetrennt und durch RuBPS gefärbt.

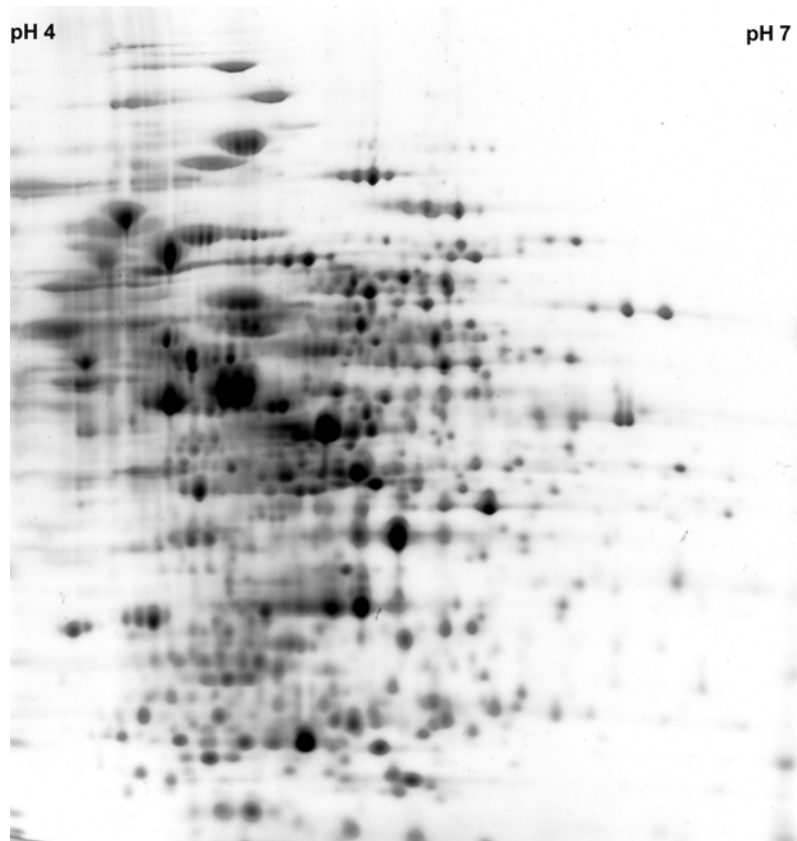


Abb. 8.5: 2D-Gel der cytosolischen Proteine von *L. innocua* CLIP11262 wt. Die Zellen wurden durch eine French Press aufgeschlossen. Die Proteine wurden durch TCA gefällt, mittels 2D-PAGE im Bereich pH 4-7 aufgetrennt und durch RuBPS gefärbt.

Tabelle 8.2: Vorhergesagte sekretorische Proteine von *L. monocytogenes* EGD-e

Gen	Name	Klasse	neu	Funktion/Ähnlichkeit
Lmo0019		7		Unknown
Lmo0105		7		Unknown, highly similar to chitinase B
Lmo0202	hly	7		Listeriolysin O precursor
Lmo0205	plcB	7		Phospholipase C
Lmo0275		7		Unknown, C-terminal part similar to B. subtilis ComEC protein
Lmo0551		7	y	Unknown
Lmo0576		7	y	Unknown, hypothetical cell wall associated protein
Lmo0585		7		Unknown, putative secreted protein
Lmo0638		7	y	Unknown
Lmo0810		7	y	Unknown, similar to spermidine/putrescine-binding protein
Lmo0881		7		Unknown
Lmo1264		7		Unknown
Lmo1585		7	y	Unknown, similar to proteases
Lmo1654		7		Unknown, putative cell surface protein
Lmo1752		7		Unknown
Lmo1883		7		Unknown, similar to chitinases
Lmo2093		7		Unknown
Lmo2156		7		Unknown
Lmo2217		7		Unknown, similar to unknown proteins
Lmo2467		7		Unknown, similar to chitinase and chitin binding protein
Lmo2504		7	y	Unknown, similar to cell wall binding proteins
Lmo2522		7		Unknown, similar to hypothetical cell wall binding protein from B. subtilis
Lmo2568		7		Unknown
Lmo2776		7		Unknown
Lmo0017		6		Unknown, similar to B. anthracis CapA protein (polyglutamate capsule biosynthesis)
Lmo0086		6		Unknown
Lmo0201	plcA	6		Phosphatidylinositol-specific phospholipase c
Lmo0203	mpl	6		Zinc metalloproteinase precursor
Lmo0206		6		Unknown
Lmo0289		6		Unknown, similar to B. subtilis YycH protein
Lmo0392		6		Unknown, highly similar to B. subtilis YqfA protein
Lmo0408		6		Unknown
Lmo0453		6	y	Unknown, conserved hypothetical proteins
Lmo0462		6		Unknown
Lmo0481		6	y	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo0516		6		Unknown, similar to B. anthracis encapsulation protein CapA
Lmo0549		6	y	Unknown, similar to internalin protein
Lmo0587		6		Unknown, putative secreted protein
Lmo0601		6		Unknown, similar to cell surface protein
Lmo0724		6	y	Unknown, similar to B. subtilis YvpB protein
Lmo0755		6		Unknown, similar to unknown proteins
Lmo0778		6		Unknown
Lmo0849		6	y	Unknown, similar to amidases
Lmo0950		6	y	Unknown
Lmo0971	dltD	6	y	DltD protein for D-alanine esterification of lipoteichoic acid and wall teichoic acid
Lmo1205		6	y	Unknown, similar to putative cobalt transport protein CbiN
Lmo1303		6		Unknown, similar to B. subtilis YneA protein
Lmo1334		6	y	Unknown, similar to B. subtilis YqzD protein
Lmo1341		6	y	Unknown, weakly similar to B. subtilis comG operon protein 7 (comGG)
Lmo1343		6	y	Unknown, similar to comG operon protein 5 (comGE)
Lmo1399		6	y	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1499		6		Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1547	mreC	6	y	Unknown, similar to cell-shape determining protein MreC
Lmo1602		6	y	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1656		6		Unknown
Lmo1855		6	y	Unknown, similar to D-alanyl-D-alanine carboxypeptidases
Lmo1862		6		Unknown, similar to hypothetical proteins
Lmo1913		6		Unknown, similar to unknown proteins

Lmo1966	6	y	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo2027	6		Unknown, putative cell surface protein, similar to internalin proteins
Lmo2036 murD	6	y	Unknown, similar to UDP-N-acetylmuramoylalanine D-glutamate ligase
Lmo2039 pbpB	6	y	Unknown, similar to penicillin-binding protein 2B
Lmo2063	6	y	Unknown
Lmo2074	6	y	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo2106	6		Unknown, similar to unknown proteins
Lmo2119	6	y	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo2420	6		Unknown
Lmo2439	6		Unknown
Lmo2442	6		Unknown
Lmo2444	6	y	Unknown, similar to glycosidase
Lmo2470	6		Unknown, similar to internalin proteins
Lmo2639	6		Unknown
Lmo2686	6		Unknown
Lmo2807	6		Unknown, hypothetical secreted protein
Lmo0087	5		Unknown
Lmo0193	5		Unknown
Lmo0461	5		Unknown
Lmo0545	5		Unknown
Lmo0671	5		Unknown
Lmo0745	5		Unknown
Lmo0929	5		Unknown, similar to sortase
Lmo0951	5	y	Unknown
Lmo1078	5	y	Unknown, similar to putative UDP-glucose pyrophosphorylases
Lmo1306	5	y	Unknown, highly similar to B. subtilis YneF protein
Lmo1333	5		Unknown, similar to B. subtilis YqzC protein
Lmo1344	5	y	Unknown, similar to comG operon protein 4 (comGD)
Lmo1345	5	y	Unknown, similar to comG operon protein 3
Lmo1432	5	y	Unknown
Lmo1511	5		Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1518	5		Unknown
Lmo1529	5	y	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1786 inIC	5		Internalin C
Lmo1861	5	y	Unknown, similar to hypothetical proteins
Lmo2051	5		Unknown, weakly similar to proteases
Lmo2056	5	y	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo2089	5		Unknown, similar to lipases
Lmo2710	5		Unknown
Lmo2754	5	y	Unknown, similar to D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (penicillin-binding protein 5)
Lmo2809	5		Unknown, hypothetical secreted protein
Lmo0052	4	y	Unknown, highly similar to B. subtilis YybT protein
Lmo0362	4	y	Unknown, similar to conserved hypothetical protein
Lmo0415	4		Unknown, similar to endo-1,4-beta-xylanase
Lmo0438	4		Unknown
Lmo0441	4		Unknown, similar to penicillin-binding protein (D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase)
Lmo0443	4	y	Unknown, similar to B. subtilis transcription regulator LytR
Lmo0477	4		Unknown, putative secreted protein
Lmo0478	4		Unknown, putative secreted protein
Lmo0479	4		Unknown, putative secreted protein
Lmo0540	4		Unknown, similar to penicillin-binding protein
Lmo1088 tagB	4		Unknown, similar to teichoic acid biosynthesis protein B precursor
Lmo1128	4		Unknown
Lmo1715	4		Unknown, similar to hypothetical proteins
Lmo2181	4		Unknown, similar to unknown protein
Lmo2280	4		Protein gp23 [Bacteriophage A118]
Lmo2805	4		Unknown, hypothetical secreted protein
Lmo2808	4		Unknown, hypothetical secreted protein
Lmo0217	3	y	Unknown, similar to B. subtilis DivIC protein
Lmo1103	3	y	Unknown, highly similar to TN916 ORF13
Lmo1851	3		Unknown, similar to carboxy-terminal processing proteinase
Lmo2574	3	y	Unknown
Lmo2691 MurA	3	y	Unknown, similar to autolysin, N-acetylmuramidase

Tabelle 8.2b: Proteine, bei denen Funktion und Vorhersage für Sekretion widersprüchlich sind

Lmo0914	7	y	Unknown, similar to PTS system, IIB component
Lmo1924 tyrA	7	y	Unknown, similar to prephenate dehydrogenase
Lmo0427	6	y	Unknown, similar to PTS fructose-specific enzyme IIB component
Lmo1269	6	y	Unknown, similar to type-I signal peptidase
Lmo1720	6	y	Unknown, similar to phosphotransferase system (PTS) lichenan-specific enzyme IIB component
			Unknown, similar to phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIB component
Lmo2373	6	y	component
Lmo2680 kdpC	6	y	Potassium-transport atpase c chain
Lmo2683	6	y	Unknown, similar to cellobiose phosphotransferase enzyme IIB component
Lmo2762	6	y	Unknown, similar to PTS cellobiose-specific enzyme IIB
Lmo1095	5	y	Unknown, similar to PTS system, cellobiose-specific IIB component (cel A)
Lmo1270	5	y	Unknown, similar to signal peptidase I
Lmo1271	5	y	Unknown, similar to signal peptidase I
Lmo1936 gpsA	5	y	Unknown, similar to NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase
Lmo2666	5	y	Unknown, similar to PTS system galactitol-specific enzyme IIB component
Lmo0039	4	y	Unknown, similar to carbamate kinase
Lmo2175	4	y	Unknown, similar to dehydrogenase
Lmo2533 atpF	4	y	Unknown, highly similar to H ⁺ -transport ATP synthase chain b

Tabelle 8.2c: Aus der ursprünglichen Annotation entfernte nicht-sekretorische Proteine

Lmo0186	< 3	Similar to unknown proteins
Lmo0290	< 3	Similar to unknown proteins
Lmo0962 lemA	< 3	Listeria epitope LemA
Lmo1495	membrane	Similar to unknown proteins
Lmo1521	GW motif	Similar to N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
Lmo1601	< 3	Similar to general stress protein
Lmo2331	Lipoprotein	Similar to gp32_Bacteriophage A118 protein
Lmo2485	< 3	Similar to unknown proteins
Lmo2713	GW motif	Similar to unknown proteins
Lmo2806	< 3	Similar to unknown proteins

Tabelle 8.3: Vorhergesagte Oberflächen-assoziierte Proteine von *L. monocytogenes* EGD-e

Gen	Name	Klasse	Funktion/Ähnlichkeit
Lmo0058		7	Unknown, C-terminal hydrophobic anchor
Lmo0135		7	Similar to oligopeptide ABC transporter system substrate-binding proteins, lipoprotein
Lmo0152		7	Similar to oligopeptide ABC transporter-binding protein, lipoprotein
Lmo0159		7	Unknown, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0171		7	Unknown, similar to internalin proteins, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0175		7	Unknown, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0255		7	Unknown, similar to unknown protein, lipoprotein
Lmo0262	inIG	7	Internalin G, LPXTG motif
Lmo0263	inIH	7	Internalin H, LPXTG motif
Lmo0264	inIE	7	Internalin E, LPXTG motif
Lmo0320		7	Unknown, similar to surface protein (peptidoglycan bound, LPXTG motif)
Lmo0355		7	Unknown, similar to Flavocytochrome C Fumarate Reductase chain A, lipoprotein
Lmo0366		7	Unknown, conserved hypothetical protein, putative lipoprotein
Lmo0460		7	Unknown, putative membrane associated lipoprotein
Lmo0517		7	Unknown, similar to phosphoglycerate mutase, lipoprotein
Lmo0528		7	Unknown, hypothetical secreted protein, C-terminal hydrophobic anchor
Lmo0541		7	Unknown, similar to ABC transporter (binding protein), lipoprotein
Lmo0610		7	Unknown, similar to internalin proteins, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0627		7	Unknown, peptidoglycan bound protein similar to adhesin, LPXTG motif
Lmo0768		7	Unknown, similar to sugar ABC transporter, periplasmic sugar-binding protein, lipoprotein
Lmo0791		7	Unknown, lipoprotein
Lmo0801		7	Unknown, similar to internalin, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0821		7	Unknown, C-terminal hydrophobic anchor, lipoprotein
Lmo0842		7	Unknown, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0859		7	Unknown, similar to putative sugar ABC transporter, periplasmic sugar-binding protein, lipoprotein
Lmo0880		7	Unknown, similar to wall associated protein precursor, LPXTG motif
Lmo0945		7	Unknown, similar to C-terminal part of B. subtilis ComEC protein and to ComEA, lipoprotein
Lmo1073		7	Unknown, similar to metal binding protein (ABC transporter), lipoprotein
Lmo1076		7	Unknown, similar to autolysin (EC 3.5.1.28) (N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase), GW motif
Lmo1136		7	Unknown, similar to internalin, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo1265		7	Unknown, weakly similar to oligopeptide ABC transporter AppA (binding protein), lipoprotein
Lmo1289		7	Unknown, similar to internalin proteins, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo1290		7	Unknown, similar to internalin proteins, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo1521		7	Unknown, similar to N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, GW motif
Lmo1730		7	Unknown, similar to sugar ABC transporter binding protein, lipoprotein
Lmo1738		7	Unknown, similar to amino acid ABC transporter (binding protein), lipoprotein
Lmo1757		7	Unknown, similar to unknown protein, lipoprotein
Lmo1800		7	Unknown, similar to protein-tyrosine phosphatase, lipoprotein
Lmo1903		7	Unknown, similar to thioredoxin, lipoprotein
Lmo2007		7	Unknown, weakly similar to putative sugar-binding lipoproteins
Lmo2061		7	Unknown, similar to unknown proteins, C-terminal hydrophobic anchor
Lmo2079		7	Unknown, lipoprotein
Lmo2080		7	Unknown, lipoprotein
Lmo2125		7	Unknown, similar to maltose/maltodextrin ABC-transporter (binding protein), lipoprotein
Lmo2184		7	Unknown, similar to ferrichrome ABC transporter (binding protein), lipoprotein
Lmo2219		7	Unknown, similar to post-translocation molecular chaperone, lipoprotein
Lmo2331		7	Unknown, weakly similar to gp32 / Bacteriophage A118 protein, lipoprotein
Lmo2349		7	Unknown, similar to amino acid ABC transporter (binding protein), lipoprotein
Lmo2396		7	Unknown, similar to internalin proteins, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo2416		7	Unknown, lipoprotein
Lmo2417		7	Unknown, conserved lipoprotein (putative ABC transporter binding protein)
Lmo2431		7	Unknown, similar to B. subtilis ferrichrome ABC transporter fhuD precursor (ferrichrome-binding protein), lipoprotein
Lmo2499		7	Unknown, similar to phosphate ABC transporter (binding protein), lipoprotein
Lmo2594		7	Unknown, lipoprotein
Lmo2636		7	Unknown, conserved hypothetical lipoprotein
Lmo2637		7	Unknown, conserved lipoprotein
Lmo2713		7	Unknown, secreted protein, GW motif

Lmo2714	7	Unknown, peptidoglycan anchored protein, LPXTG motif
Lmo2812	7	Unknown, similar to D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase, lipoprotein
Lmo2839	7	Unknown, similar to sugar binding protein (ABC transporter), lipoprotein
Lmo0047	6	Unknown, lipoprotein
Lmo0153	6	Unknown, similar to a probable high-affinity zinc ABC transporter (Zn(II)-binding lipoprotein)
Lmo0181	6	Unknown, similar to sugar ABC transporter, sugar-binding protein, lipoprotein
Lmo0285	6	Unknown, putative lipoprotein
Lmo0324	6	Unknown, lipoprotein
Lmo0327	6	Unknown, similar to cell surface proteins, LPXTG motif
Lmo0331	6	Unknown, similar to internalin, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0433 inlA	6	Internalin A, LPXTG motif
Lmo0463	6	Putative peptidoglycan linked protein, LPXTG motif
Lmo0514	6	Unknown, similar to internalin protein, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0550	6	Unknown, peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0552	6	Unknown, similar to unknown proteins, C-terminal hydrophobic anchor
Lmo0582 iap	6	P60 extracellular protein, invasion associated protein iap
Lmo0586	6	Unknown, C-terminal hydrophobic anchor
Lmo0617	6	Unknown, lipoprotein
Lmo0701	6	Unknown, C-terminal hydrophobic anchor
Lmo0725	6	Unknown, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0732	6	Unknown, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0835	6	Unknown, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0953	6	Unknown, lipoprotein
Lmo1016 gbuC	6	Unknown, highly similar to glycine betaine ABC transporters (glycine betaine-binding protein), lipoprotein
Lmo1068	6	Unknown, lipoprotein
Lmo1104	6	Unknown, highly similar to TN916 ORF14 and to <i>L. monocytogenes</i> P60 protein
Lmo1115	6	Unknown, similar to fibrinogen-binding protein, LPXTG motif
Lmo1340	6	Unknown, similar to <i>B. subtilis</i> YqgU protein, lipoprotein
Lmo1379	6	Unknown, similar to <i>B. subtilis</i> SpoIIJ protein, lipoprotein
Lmo1388 tcsA	6	Unknown, CD4+ T cell-stimulating antigen, lipoprotein
Lmo1413	6	Unknown, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo1426 opuCC	6	Unknown, similar to glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter (osmoprotectant-binding protein), lipoprotein
Lmo1444	6	Unknown, similar to protein secretion PrsA (post-translocation molecular chaperone), lipoprotein
Lmo1649	6	Unknown, lipoprotein
Lmo1666	6	Unknown, peptidoglycan linked protein, LPXTG motif
Lmo1671	6	Unknown, similar to ABC transporter and adhesion proteins, lipoprotein
Lmo1847	6	Unknown, similar to adhesion binding proteins and lipoproteins with multiple specificity for metal cations (ABC transporter), lipoprotein
Lmo1959	6	Unknown, similar to ferrichrome binding protein, lipoprotein
Lmo2026	6	Unknown, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo2085	6	Unknown, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo2178	6	Unknown, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo2179	6	Unknown, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo2185	6	Unknown, C-terminal hydrophobic anchor
Lmo2186	6	Unknown, C-terminal hydrophobic anchor
Lmo2196	6	Unknown, similar to pheromone ABC transporter (binding protein), lipoprotein
Lmo2446	6	Unknown, similar to glycosidase, lipoprotein
Lmo2505 spl	6	Peptidoglycan lytic protein P45
Lmo2558 ami	6	autolysin, amidase, GW motif
Lmo2569	6	Unknown, similar to dipeptide ABC transporter (dipeptide-binding protein), lipoprotein
Lmo2576	6	Unknown, peptidoglycan anchored protein, LPXTG motif
Lmo2578	6	Unknown, lipoprotein
Lmo2591	6	Unknown, surface protein similar to N-acetylmuramidase, GW motif
Lmo2595	6	Unknown, similar to unknown proteins, lipoprotein
Lmo2642	6	Unknown, lipoprotein
Lmo2854	6	Unknown, highly similar to <i>B. subtilis</i> SpoIIJ protein, lipoprotein
Lmo0013 qoxA	5	AA3-600 quinol oxidase subunit II, lipoprotein
Lmo0082	5	Unknown, C-terminal hydrophobic anchor
Lmo0130	5	Unknown, similar to 5'-nucleotidase, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0160	5	Unknown, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0204 actA	5	Actin-assembly inducing protein precursor, C-terminal hydrophobic anchor
Lmo0207	5	Unknown, hypothetical lipoprotein

Lmo0303	5	Unknown, putative secreted, lysin rich protein, lipoprotein
Lmo0333	5	Unknown, similar to internalin proteins, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0394	5	Unknown, similar to <i>L. monocytogenes</i> extracellular P60 protein
Lmo0409 inIF	5	Unknown, similar to internalin, peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0435	5	Unknown, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0510	5	Unknown, lipoprotein
Lmo1041	5	Unknown, similar to molybdate ABC transporter binding protein, lipoprotein
Lmo1215	5	Unknown, similar to N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (autolysin), GW motif
Lmo1216	5	Unknown, similar to N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (autolysin), GW motif
Lmo1653	5	Unknown, putative cell surface protein, lipoprotein
Lmo2203	5	Unknown, similar to N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and to internalin B, GW motif
Lmo2821	5	Unknown, similar to internalin, Unknown, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif
Lmo0434 inIB	4	Internalin B, GW motif
Lmo1799	4	Unknown, putative peptidoglycan bound protein, LPXTG motif

Tabelle 8.4: Vorhergesagte assoziierte und integrale Membranproteine von *L. monocytogenes*

Gen	Name	Klasse	Funktion/Ähnlichkeit
Lmo0029		7	Unknown
Lmo0057		7	Unknown, similar to B. subtilis YueB protein
Lmo0365		7	Unknown, similar to conserved hypothetical protein
Lmo0404		7	Unknown
Lmo0530		7	Unknown
Lmo0666		7	Unknown, similar to unknown protein
Lmo0847		7	Unknown, similar to Glutamine ABC transporter (binding transport protein)
Lmo1021		7	Unknown, similar to two-component sensor histidine kinase in B. subtilis YvqE protein
Lmo1226		7	Unknown, similar to transporter (B. subtilis YdgH protein)
Lmo1252		7	Unknown, similar to B. subtilis YxkD protein
Lmo1391		7	Unknown, similar to sugar ABC transporter, permease protein
Lmo1527		7	Unknown, similar to protein-export membrane protein SecDF
Lmo1686		7	Unknown, similar to hypothetical proteins
Lmo1971		7	Unknown, similar to pentitol PTS system enzyme II C component
Lmo2062		7	Unknown, similar to copper export proteins
Lmo2171		7	Unknown, similar to antiporter proteins
Lmo2249		7	Unknown, similar to low-affinity inorganic phosphate transporter
Lmo2443		7	Unknown
Lmo2688		7	Unknown, similar to cell division protein FtsW
Lmo0037		6	Unknown, similar to amino acid transporter
Lmo0088		6	Unknown, similar to ATP synthase C chain
Lmo0094		6	Unknown
Lmo0220	ftsH	6	Unknown, highly similar to cell division protein ftsH
Lmo0288		6	Unknown, similar to two-component sensor histidine kinase
Lmo0405		6	Unknown, similar to phosphate transporter protein
Lmo0412		6	Unknown
Lmo0428		6	Unknown, similar to PTS fructose-specific enzyme IIC component
Lmo0448		6	Unknown, similar to amino acid antiporter
Lmo0452		6	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo0475		6	Unknown
Lmo0621		6	Unknown, conserved hypothetical protein
Lmo0626		6	Unknown, similar to unknown protein
Lmo0680		6	Unknown, similar to flagella-associated protein flhA
Lmo0685		6	Unknown, similar to motility protein (flagellar motor rotation) MotA
Lmo0731		6	Unknown
Lmo0836		6	Unknown, similar to B. subtilis YrkR protein
Lmo0843		6	Unknown, similar to B. subtilis protein YsdA
Lmo0867		6	Unknown
Lmo0872		6	Unknown, similar to antibiotic resistance protein
Lmo0952		6	Unknown
Lmo0954		6	Unknown
Lmo0981		6	Unknown, similar to efflux transporter
Lmo0985		6	Unknown
Lmo1004		6	Unknown, conserved hypothetical protein
Lmo1071		6	Unknown, similar to cell-division protein RodA and FtsW
Lmo1131		6	Unknown, similar to ABC transporters, ATP-binding proteins
Lmo1190		6	Unknown
Lmo1204		6	Unknown, similar to cobalamin biosynthesis protein M
Lmo1210		6	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1300		6	Unknown, similar to arsenic efflux pump protein
Lmo1352		6	Unknown
Lmo1416		6	Unknown
Lmo1429		6	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1461		6	Unknown
Lmo1526		6	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1568		6	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1623		6	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1650		6	Unknown, similar to hypothetical proteins

Lmo1696	6	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1909	6	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1911	6	Unknown, similar to unknown proteins (hypothetical sensory transduction histidine kinase)
Lmo1945	6	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1947 resE	6	Unknown, similar to two-component sensor histidine kinase
Lmo1957 fhuG	6	Unknown, similar to ferrichrome ABC transporter (permease)
Lmo2017	6	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo2058 ctaA	6	Unknown, similar to hemeO oxygenase
Lmo2070	6	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo2081	6	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo2092 betL	6	Glycine betaine transporter BetL
Lmo2129	6	Unknown
Lmo2135	6	Unknown, similar to PTS system, fructose-specific enzyme IIC component
Lmo2183	6	Unknown, similar to ferrichrome ABC transporter (permease)
Lmo2224	6	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo2232	6	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo2250 arpJ	6	Unknown, similar to amino acid ABC transporter permease protein
Lmo2330	6	Unknown, similar to protein gp33 [Bacteriophage A118]
Lmo2362	6	Unknown, similar to amino acid antiporter (acid resistance)
Lmo2377	6	Unknown, similar to multi-drug resistance efflux pump
Lmo2381	6	Unknown, similar to proteins involved in resistance to cholate / NA(+) and in pH homeostasis
Lmo2384	6	Unknown, similar to proteins involved in resistance to cholate / NA(+) and in pH homeostasis
Lmo2387	6	Unknown, conserved hypothetical protein
Lmo2399	6	Unknown, similar to conserved hypothetical proteins
Lmo2409	6	Unknown
Lmo2410	6	Unknown
Lmo2451	6	Unknown, similar to preprotein translocase subunit SecG
Lmo2497	6	Unknown, similar to phosphate ABC transporter permease protein
Lmo2500 phoR	6	Two-component sensor histidine kinase
Lmo2503	6	Unknown, similar to cardiolipin synthase
Lmo2518	6	Unknown, similar to B. subtilis putative transcriptional regulator LytR
Lmo2519	6	Unknown, similar to B. subtilis TagO teichoic acid linkage unit synthesis protein
Lmo2534 atpE	6	Unknown, highly similar to H ⁺ -transporting ATP synthase chain c
Lmo2582	6	Unknown, similar to two-component sensor histidine kinase
Lmo2640	6	Unknown
Lmo2687	6	Unknown
Lmo2716 cydC	6	Unknown, highly similar to ABC transporter required for expression of cytochrome BD
Lmo2775	6	Unknown, hypothetical membrane protein
Lmo2793	6	Unknown
Lmo2845	6	Unknown, similar to transmembrane efflux proteins
Lmo0136	5	Unknown, similar to oligopeptide ABC transporter permease protein
Lmo0179	5	Unknown, similar to sugar ABC transporter permease proteins
Lmo0180	5	Unknown
Lmo0269	5	Unknown, similar to transporter
Lmo0349	5	Unknown
Lmo0350	5	Unknown
Lmo0403	5	Unknown
Lmo0414	5	Unknown, conserved membrane protein
Lmo0419	5	Unknown, similar to unknown protein
Lmo0449	5	Unknown
Lmo0450	5	Unknown, similar to unknown protein
Lmo0523	5	Unknown, similar to B. subtilis YybC protein
Lmo0596	5	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo0598	5	Unknown, similar to proteins involved in biotin metabolism (BioY)
Lmo0603	5	Unknown
Lmo0607	5	Unknown, similar to ABC transporter ATP-binding protein
Lmo0632	5	Unknown, similar to PTS system, fructose-specific IIC component
Lmo0642	5	Unknown
Lmo0676	5	Unknown, similar to flagellar biosynthesis protein FliP
Lmo0757	5	Unknown, similar to hypothetical proteins
Lmo0767	5	Unknown, similar to ABC transp. permease protein
Lmo0805	5	Unknown
Lmo0839	5	Unknown, similar to Tetracycline resistance protein

Lmo0860	5	Unknown, similar to sugar ABC transporter permease protein
Lmo0897	5	Unknown, similar to transporter proteins
Lmo0921	5	Unknown, similar to B. subtilis YcgQ protein
Lmo0925	5	Unknown, putative membrane protein
Lmo0998	5	Unknown, similar to hypothetical protein
Lmo1020	5	Unknown, similar to B. subtilis YvqF protein
Lmo1026	5	Unknown, similar to B. subtilis LytR protein
Lmo1040	5	Unknown, similar to molybdenum ABC transporter permease
Lmo1061	5	Unknown, similar to two-component sensor histidine kinase
Lmo1101	5	Unknown, similar to lipoprotein signal peptidase
Lmo1211	5	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1284	5	Unknown, conserved hypothetical protein similar to B. subtilis YneS protein
Lmo1390	5	Unknown, similar to ABC transporter permease proteins
Lmo1396	5	Unknown, similar to phosphatidylglycerophosphate synthase
Lmo1409	5	Unknown, similar to multidrug-efflux transporter
Lmo1508	5	Unknown, similar to two-component sensor histidine kinase
Lmo1516	5	Unknown, similar to ammonium transporter NrgA
Lmo1546 mreD	5	Unknown, similar to cell-shape determining protein MreD
Lmo1550 comC	5	Unknown, similar to B. subtilis late competence protein ComC (type IV prepilin peptidase)
Lmo1624	5	Unknown
Lmo1625	5	Unknown, similar to putative transporters
Lmo1637	5	Unknown, similar to membrane proteins
Lmo1640	5	Unknown
Lmo1682	5	Unknown, similar to transmembrane transport proteins
Lmo1690	5	Unknown, similar to hypothetical proteins
Lmo1731	5	Unknown, similar to sugar ABC transporter permease protein
Lmo1732	5	Unknown, similar to sugar ABC transporter permease protein
Lmo1762	5	Unknown
Lmo1963	5	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1980	5	Unknown
Lmo2001	5	Unknown, similar to PTS mannose-specific enzyme IIC component
Lmo2011	5	Unknown, similar to two-component sensor histidine kinase
Lmo2116	5	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo2140	5	Unknown, similar to ABC transporter membrane protein
Lmo2150	5	Unknown
Lmo2195	5	Unknown, weakly similar to B. subtilis comG operon protein comGG
Lmo2204	5	Unknown, similar to unknown protein
Lmo2255	5	Unknown
Lmo2279	5	Holin [Bacteriophage A118]
Lmo2360	5	Unknown, transmembrane protein
Lmo2371	5	Unknown, similar to putative ABC-transporter transmembrane subunit
Lmo2378	5	Unknown, similar to proteins involved in resistance to cholate / NA(+) and in pH homeostasis
Lmo2379	5	Unknown, similar to proteins involved in resistance to cholate / NA(+) and in pH homeostasis
Lmo2382 mrpE	5	Unknown, similar to proteins involved in resistance to cholate / NA(+) and in pH homeostasis
Lmo2423	5	Unknown, conserved hypothetical protein
Lmo2427	5	Unknown, similar to cell division proteins RodA, FtsW
Lmo2428	5	Unknown, similar to cell division proteins RodA, FtsW
Lmo2430	5	Unknown, similar to B. subtilis ferrichrome ABC transporter permease FhuG
Lmo2490	5	Unknown, similar to B. subtilis CsbA protein
Lmo2492	5	Unknown
Lmo2508	5	Unknown, similar to conserved hypothetical proteins
Lmo2553	5	Unknown, conserved hypothetical protein
Lmo2567	5	Unknown
Lmo2570	5	Unknown
Lmo2581	5	Unknown, conserved hypothetical protein
Lmo2602	5	Unknown, conserved hypothetical protein
Lmo2649	5	Unknown, similar to hypothetical PTS enzyme IIC component
Lmo2706	5	Unknown
Lmo2715 cydD	5	Unknown, highly similar to ABC transporter ATP-binding protein required for the expression of cytochrome BD
Lmo2738	5	Unknown, conserved hypothetical protein similar to hypothetical hemolysin
Lmo2753	5	Unknown
Lmo2768	5	Unknown, hypothetical membrane protein

Lmo2778	5	Unknown
Lmo2799	5	Unknown, similar to phosphotransferase system mannitol-specific enzyme IIBC
Lmo2818	5	Unknown, similar to transmembrane efflux protein
Lmo2838	5	Unknown, similar to sugar ABC trans. permease protein
Lmo0361	4	Unknown, similar to conserved hypothetical integral membrane protein
Lmo0584	4	Unknown, conserved hypothetical membrane protein
Lmo0639	4	Unknown, similar to transcription regulator (surface protein PAg negative regulator par)
Lmo0641	4	Unknown, similar to heavy metal-transp. ATPase
Lmo0650	4	Unknown, conserved membrane protein
Lmo0656	4	Unknown, conserved hypothetical protein
Lmo0723	4	Unknown, similar to methyl-accepting chemotaxis protein
Lmo0766	4	Unknown, similar to putative sugar ABC transporter permease protein
Lmo0804	4	Unknown
Lmo0853	4	Unknown, similar to E. coli SugE protein transmembrane chaperone
Lmo0861	4	Unknown, similar to sugar ABC transporter permease protein
Lmo0908	4	Unknown, similar to membrane proteins
Lmo0947	4	Unknown, hypothetical transporter protein
Lmo0963	4	Unknown, similar to putative heat shock protein HtpX, Listeria epitope LemB
Lmo0987	4	Unknown, similar to St. agalactiae CylB protein
Lmo1056	4	Unknown
Lmo1062	4	Unknown, similar to ABC transporter permease protein
Lmo1224	4	Unknown, similar to different proteins
Lmo1378	lisK	Two-component sensor histidine kinase
Lmo1506	4	Unknown, similar to transporter
Lmo1617	4	Unknown, similar to multidrug-efflux transporter
Lmo1652	4	Unknown, similar to ABC transporter ATP-binding protein
Lmo1761	4	Unknown, similar to putative sodium-dependent transporter
Lmo1884	4	Unknown, similar to xanthine permeases
Lmo1920	4	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1958	fhuB	Unknown, similar to ferrichrome ABC transporter permease
Lmo2009	4	Unknown, similar to putative transport system integral membrane protein
Lmo2123	4	Unknown, similar to maltodextrin ABC-transport system (permease)
Lmo2145	4	Unknown, similar to unknown protein
Lmo2239	4	Unknown
Lmo2264	4	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo2347	4	Unknown, similar to amino acid ABC transporter permease
Lmo2588	4	Unknown, similar to drug-export proteins
Lmo2612	secY	Unknown, highly similar to preprotein translocase subunit
Lmo2745	4	Unknown, similar to ABC transporter ATP-binding protein
Lmo2752	4	Unknown, similar to ABC transporter ATP-binding protein
Lmo2826	4	Unknown, similar to efflux proteins
Lmo2837	4	Unknown, similar to sugar ABC transporter permease protein
Lmo0073	3	Unknown
Lmo0195	3	Unknown, similar to membrane protein putative ABC transporter component
Lmo0215	3	Unknown, conserved membrane-spanning protein
Lmo0298	3	Unknown, similar to PTS beta-glucoside-specific enzyme IIC component
Lmo0444	3	Unknown, conserved hypothetical protein
Lmo0527	3	Unknown, transmembrane protein
Lmo0645	3	Unknown, similar to amino acid transporter
Lmo0838	uhpT	Unknown, highly similar to hexose phosphate transport protein
Lmo0876	3	Unknown, similar to PTS system, Lichenan-specific enzyme IIC component
Lmo0980	3	Unknown, similar to ABC transporter transmembrane component
Lmo1105	3	Unknown, highly similar to TN916 ORF15
Lmo1112	3	Unknown, highly similar to TN916 ORF21
Lmo1206	cbiQ	Unknown, similar to cobalt transport protein Q
Lmo1438	3	Unknown, similar to penicillin-binding protein
Lmo1495	3	Unknown, similar to unknown proteins
Lmo1740	3	Unknown, similar to amino acid (glutamine) ABC transporter permease protein
Lmo1864	3	Unknown, similar to hemolysin III proteins, putative integral membrane protein
Lmo1892	pbpA	Unknown, similar to penicillin-binding protein 2A
Lmo2034	divIB	Unknown, similar to cell-division initiation protein divIB
Lmo2043	3	Unknown, similar to integral membrane proteins
Lmo2122	3	Unknown, similar to maltodextrose utilization protein MalA

Lmo2229	3	Unknown, similar to penicillin-binding protein	
Lmo2231	3	Unknown, similar to unknown proteins	
Lmo2254	3	Unknown, similar to unknown proteins	
Lmo2418	3	Unknown, similar to ABC transporter permease protein	
Lmo2421	3	Unknown, similar to two-component sensor histidine kinase	
Lmo2482	lgt	3	Unknown, highly similar to prolipoprotein diacylglyceryl transferase
Lmo2498	3	Unknown, similar to phosphate ABC transporter permease protein	
Lmo2506	ftsX	3	Unknown, highly similar to cell-division protein FtsX
Lmo2850	3	Unknown, similar to sugar transport proteins	